

Zellkataphoretische Untersuchungen der
Erythrozytenoberfläche nach Besetzung mit
dem Virus der Klassischen Geflügelpest

Eberhard ~~—~~ Straub

1961

Aus der Kinder-Poliklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Gerhard Weber

ZELKATAPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN
DER ERYTHROZYTEN OBERFLÄCHE
NACH BESETZUNG MIT DEM VIRUS DER
KLASSISCHEN GEFLÜGELPEST

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Eberhard Straub
aus
Dietersweiler

München 1961

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. Dr. Hermann Eyer

Referent: Prof. Dr. Gerhard Ruhenstroth-Bauer

Correferent: Prof. Dr. Gerhard Weber

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Januar 1961



INHALTSVERZEICHNIS

Seite

Erster Teil

GRUNDLAGEN

A. DIE HAEMAGGLUTINATION DURCH VIRUS	1
1. Phänomenologie der virusbedingten Haemagglutination	2
2. Die Beziehung zwischen dem Virushaemagglutinin und den übrigen Virusfunktionen in qualitativer und quantitativer Hinsicht	3
3. Das biochemische Problem der Reaktion des Virus-haemagglutinins mit der Erythrozytenoberfläche	4
4. Die "unspezifische" Hemmung der Haemagglutination und die nicht virusbedingte Haemagglutination	6
B. DIE ZELLKATAPHORESE	8
1. Physikalische Voraussetzungen der Zellkataphorese	8
2. Beschreibung der Apparatur	13
3. Meßtechnik, Fehlerquellen und Fehlerbreite der zellkataphoretischen Methode	15

Zweiter Teil

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

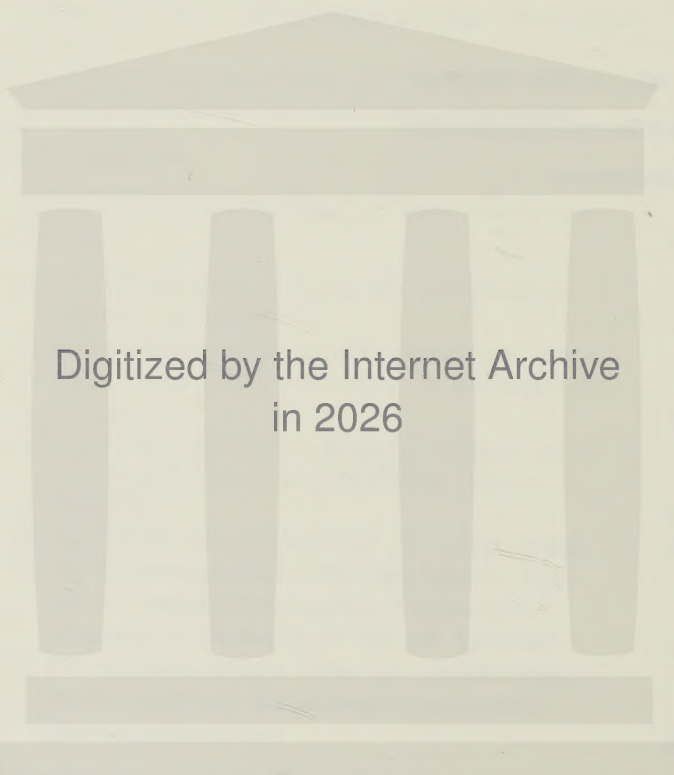
C. DIE FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	21
D. MATERIAL UND METHODEN	23
1. Das Ausgangsmaterial und seine Gewinnung	23
a) Die Suspensionsflüssigkeit	23
b) Das Zellgut	23
c) Das Viruspräparat	24
d) Das Antiserum	30
2. Methoden zur Prüfung des Materials	31
a) Der Virusnachweis im Haemagglutinationstest	31
b) Der Antikörpernachweis im Hemmungstest	34

	Seite
E. VORVERSUCHE	36
1. Der isoelektrische Punkt nativer Hühnererythrozyten	36
2. Der Unterschied in der Agglutinationskraft des K.P.Virus gegenüber Hühner- und humanen Erythrozyten	38
3. Die Hemmwirkung von Virus-Antisera auf die durch aktives und inaktives K.P.Virus bedingte Haemagglutination	39
4. Der Einfluß von Ionenstärke und Säuregrad des Reaktionsmilieus auf den Haemagglutinationstiter	40
F. HAUPTVERSUCHE	46
1. Untersuchungen von Erythrozyten nach Besetzung mit Virus	46
a) Die Festigkeit der Bindung von inaktiviertem Virus an die Zelle	46
b) Die elektrokinetischen Zellveränderungen durch natives oder inaktiviertes Virus in Abhängigkeit von der Zeit	47
c) Die elektrokinetischen Zellveränderungen durch inaktiviertes Virus in Abhängigkeit von der Virusdosis	50
d) Der Einfluß von Perjodat auf das Zellpotential	54
e) Der elektrokinetische Effekt des nativen Virus auf die perjodatvorbehandelte Erythrozytenmembran in Abhängigkeit von der Virusdosis	56
f) Der elektrokinetische Effekt des perjodatinaktivierten Virus auf die perjodatvorbehandelte Erythrozytenmembran	59
2. Untersuchung virusbesetzter Erythrozyten nach Behandlung mit Antisera	61
a) Unspezifische elektrokinetische Wirkungen von Antisera	62
b) Virusspezifische elektrokinetische Wirkungen von Antisera auf virusbesetzte Erythrozyten	63
c) Der spezifische und quantitative Nachweis des Virus mit Hilfe der kataphoretischen Methode	65

	Seite
d) Kontrollversuche	67
e) Der Einfluß der H-Ionenkonzentration auf die spezifischen elektrokinetischen Virus- und Anti- körperwirkungen an der Erythrozytenmembran	68
3. Zusammenfassung	70

ANHANG

G. VERSUCHSPROTOKOLLE	73
H. LITERATURVERZEICHNIS	93
LEBENS LAUF	103



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Erster Teil

GRUNDLAGEN

A. DIE HAEMAGGLUTINATION DURCH VIRUS

(Das Phänomen und seine Analyse - Literaturübersicht)

1. Phänomenologie der virusbedingten Haemagglutination

HIRST (1) sowie McCLELLAND und HARE (2) stellten der Virusforschung im Jahre 1941 ein durchaus neues Thema - : die haemagglutinierende Qualität der Virusarten -, als sie (gleichzeitig) die folgende Beobachtung mitteilten: vermischt sich - etwa aus Anlaß der routinemäßigen Influenza-Virusernie von infizierten Hühnerembryonen - Hühnerblut aus zufällig verletzten Gefäßen mit virushaltiger Allantoisflüssigkeit, so verklumpen die roten Zellen, und zwar ohne nennenswerten Verzug. Die an dieses Ereignis geknüpfte Erwartung der genannten Autoren, daß sich die Erscheinung in vergleichbar deutlicher Ausprägung *in vitro* reproduzieren und zur Virus-titration verwerten lassen würde, bestätigte sich.

Die Entdecker des Phänomens und andere Untersucher waren zunächst mit der entscheidenden Frage nach der Spezifität der festgestellten haemagglutinierenden Wirkung von Influenza-Virus befaßt. Die alsbald ermittelte Tatsache, daß auch Influenza-Virus anderer Provenienz (Lungenpräparate) Hühnererythrozyten zu verklumpen vermag, stützte die Annahme einer spezifischen Virusfunktion (3, 4); die qualitativ und quantitativ eindeutige Agglutinationshemmung durch korrespondierende Virusantiseren konnte weiterhin als Bestätigung gewertet werden (1, 3, 5, 6, 7); und der Nachweis endlich, daß das haemagglutinierende Prinzip in der Ultrazentrifuge sich mit der Zahl der Virusteilchen anreichert, tilgte die letzten Zweifel an der virusspezifischen Natur des Haemagglutinins (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14). - Weitere Befunde (wie z.B. die Feststellung einer deutlichen gegenseitigen Abhängigkeit von Infektiosität und Haemagglutinationskraft) waren durchweg geeignet, die Vorstellung von einer distinkten haemagglutinierenden Qualität, die mit den zuvor bekannten Eigenschaften des Virus (Infektiosität, antigenes und komplementbindendes Vermögen, Toxizität) in eine Reihe zu stellen ist, endgültig zu festigen (3).

Ferner wurden die roten Blutkörperchen der verschiedensten Spezies auf ihre Agglutinabilität durch Virus bzw. eine Serie von Virusarten auf ihr "Agglutinationsspektrum" im Tierreich und auf ihre Agglutinationskraft hin geprüft (15, 16, 17, 18, 2, 19, 4, 20, 16, 21, 22, 23). Diese Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, daß einerseits diverse Virusarten agglutinierende Aktivität zu entfalten vermögen, andererseits die Zellen vieler Tierarten mit Virus reagieren können. Für eine bestimmte Tierart besteht allerdings zwischen natürlicher Virusempfänglichkeit und Agglutinabilität der Erythrozyten, bezogen auf eine bestimmte Virusart, keine Abhängigkeit.

Experimente, welche die Virus-Erythrozyten-Reaktion mit schärferen Augen zu betrachten und den "Rhythmus" ihres Verlaufs zu analysieren gestatteten, wurden schon früh mit Erfolg angestellt (1, 24, 2). Sie machten sichtbar, daß der Vorgang in zwei zeitlich sich folgende Stufen gegliedert ist: die "Adsorptionsphase" wird von der "Elutionsphase" abgelöst.

Dabei imponiert in der Phase der Adsorption die Raschheit und die Vollständigkeit, mit der sich das Haemagglutinin bzw. die Viruspartikel der Zelloberfläche anlagern und damit die Verklumpung der Blutkörperchen bewirken; aktives wie inaktiviertes Virus wird gleichermaßen an die Erythrozyten gebunden und besitzt offenbar eine erhebliche Affinität zur agglutinablen Membran (24, 25). - Im "zweiten Akt", in der Elutionsphase, löst sich das Haemagglutinin spontan von der Zellwand und reichert sich allmählich wieder in der Suspensionsflüssigkeit an; allerdings ist nur voll aktives Virus imstande, in der angegebenen Weise abzusozialisieren (24, 26, 25).

Wird das befreite Virus nun erneut mit agglutinablen Erythrozyten zusammengegeben, so erweist es sich als in seiner haemagglutinierenden Aktivität nicht beeinträchtigt (24). Die Zellsuspension, die mit der Viruselution ihre primäre Stabilität zurückerhalten hat, erscheint dagegen verändert: sie ist nicht länger agglutinabel, vielmehr gegenüber neuerlicher, homologer Viruszufuhr refraktär (24, 27).

2. Die Beziehungen zwischen dem Virushaemagglutinin und den übrigen Virusfunktionen in qualitativer und quantitativer Hinsicht

Die charakteristische Reaktionskinetik der virusbedingten Agglutination erweckte das Interesse für das Problem der chemischen Natur des haemagglutinierenden Virusprinzips. Im Zusammenhang mit entsprechenden Untersuchungen wurden u. a. die Beziehungen zwischen Haemagglutination, Infektiosität, Antikörperbindung und Stabilität erforscht. (Für die vorliegende Arbeit sind diese Befunde insofern wesentlich, als wir uns um ein Verfahren zum Virusnachweis bemühten, welches das Viruspartikel gewissermaßen sowohl bei seinem haemagglutinierenden als auch bei seinem antikörperbindenden Prinzip faßt.) Dabei stand die vergleichende Prüfung der Resistenz der verschiedenen Viruseigenschaften gegen inaktivierende Maßnahmen am Anfang.

Es zeigte sich, daß die bislang aufgefundenen Virushaemagglutinine gegenüber thermischen Einflüssen durchweg stabiler sind als jene chemischen Körper am Virus, die für die infektiöse Aktivität verantwortlich sind. Erst in der Temperaturzone von 50°C bis 60°C tritt bei mehr oder weniger protrahierter Wärmeeinwirkung im allgemeinen ein Verlust des haemagglutinierenden Vermögens ein. (Virusproben vom selben Stamm unterscheiden sich in ihrer jeweiligen Thermostabilität oft erheblich; im übrigen ist der Titer von Milieufaktoren abhängig, z. B. von der Ione des Suspensionsmediums. Die gelegentliche Erhöhung des Titers durch Erwärmung ist auf einen veränderten Dispersitätsgrad zurückzuführen) (27, 28, 26, 29, 25, 30, 31).

Formalin, Aether und Perjodat bewirken eine Schädigung der Virusfunktionen in dem Sinne, daß sie bei Zuführung in niedriger Konzentration bzw. bei kurzdauernder Anwendung zunächst (isoliert) die infektiöse Aktivität mindern, bei gesteigerter Intensität nacheinander die toxischen und haemagglutinierenden Eigenschaften beeinträchtigen, gegen das antigene Prinzip aber vergleichsweise am wenigsten auszurichten vermögen (24, 27, 32, 33, 34, 35). - Ultraviolettes Licht entfaltet eine entsprechende Wirkung auf das Virus (32, 27), und auch durch Einstellung der Suspensionsflüssigkeit auf eine bestimmte H-Ionenstärke können die Virusfunktionen in ähnlicher Weise gedämpft oder ausgeschaltet werden (bei saurer Reaktion rascher als bei alkalischer) (36). - Die in der Literatur mitgeteilten Ergebnisse der Dialyse-Versuche sind widerspruchsvoll (37, 38).

HENLE und HENLE analysierten unter besonderer Beachtung des Zeitfaktors

den Prozeß der Virusproduktion durch die infizierte Zelle (Allantoissack) und ermittelten für jedes einzelne Virusprinzip eine charakteristische Kurve. Das zusammenfassende Schaubild gibt Auskunft über das erste Auftreten, die maximale Ausprägung und das Verhalten des Titerniveaus mit der Zeit jeweils für eine Virusqualität. Danach reduziert sich die zuerst ausgebildete **Infektiosität rasch**, während das Haemagglutinin längere Zeit persistiert. Die toxische Aktivität, die erst spät nachzuweisen ist, zeichnet sich durch Flüchtigkeit aus; das komplementbindende Antigen dagegen, das zuletzt in Erscheinung tritt, ist stabil (39, 40, 41, 42, 43).

Diese Verhältnisse sind freilich keineswegs konstant, vielmehr ist eine Änderung der Proportionen nach Tierpassagen beobachtet worden (44, 45, 46, 47, 48). - Ferner besteht eine gewisse Abhängigkeit der Werte vom Ausmaß und von der Technik des Reinigungsprozesses sowie von Milieufaktoren (Fixierung an natürliche Inhibitoren) (14, 49, 3, 4, 50, 51, 52, 53). - Die Schwankungen der aus den Titern der verglichenen Virusfunktionen errechneten Quotienten können u.a. auch daher rühren, daß im einen Fall - Messung der Infektiosität - nur voll aktives Virus, im anderen Fall - Messung des Haemagglutinis - zusätzlich inaktiviertes, also nichtinfektiöses Virus ausgetitriert wird. Wie schon oben dargetan wurde, sind die beiden Funktionen allen schädigenden Agentien gegenüber unterschiedlich resistent. - Zu beachten ist ferner die Tatsache, daß die Bestimmungsmethoden für die einzelnen Virusqualitäten in der Genauigkeit ihrer Resultate nicht übereinstimmen.

3. Das biochemische Problem der Reaktion des Virus-haemagglutinins mit der Erythrozytenoberfläche

Die erwähnten Kenntnisse von der differentiellen Resistenz der Virusqualitäten gegenüber schädigenden Maßnahmen lassen sich nun nützen, um eine "Dissoziation" der Virusfunktionen in vitro zu erreichen: wird eine Virussuspension schonend inaktiviert, so verliert sie u.U. ihre Infektiosität, bleibt aber in ihrer haemagglutinierenden Aktivität ungemindert (24, 32, 54, 55). (In vivo sind die geweblichen Hemmstoffe durchaus imstande, auf dem Wege der einseitigen Maskierung des Haemagglutinins eine solche "Dissoziation" herbeizuführen). - Die früh getroffene Feststellung, daß solchermaßen vorbehandeltes Virus bei voll erhaltener Fähigkeit zur Adsorption sich nicht mehr spontan von den agglutinierten Zellen abspaltet, erzwang die Annahme, daß am Virushaemagglutinin seinerseits zwei distinkte Prinzipien von

unterschiedlicher Stabilität Anteil haben:

1. das adsorptive Vermögen und
2. die spezifische Funktion, die für die Vorgänge während der Elutionsphase verantwortlich ist (24, 25, 26).

Der - im Gegensatz zur "physikalischen" Adsorptionsphase - ausgesprochen "biologische" Charakter der Elutionsphase (Abhängigkeit von Milieufaktoren, insbesondere von der Temperatur und dem Zustand der Reaktionsteilnehmer), die Reversibilität der unbeeinflussten Virus-Erythrozyten-Reaktion sowie die letztliche Unversehrtheit des Virus veranlaßten (als ersten) HIRST, die Theorie von der Fermentnatur des Virushaemagglutinins aufzustellen, da die Gegebenheiten alle Kriterien eines katalytischen Prozesses erfüllen (24). - Die Art der inaktivierenden Einflüsse, vor allem die Wirkung proteidenaturierender Fermente, spricht für die Eiweißnatur des Haemagglutinins, das im übrigen noch nicht in reiner Form isoliert werden konnte. Das mit dem Haemagglutinin in Reaktion tretende Substrat der Zelle, der virusspezifische Rezeptor, scheint hitzebeständiger, jedoch ebenfalls labil gegenüber Perjodat und proteolytischen Fermenten zu sein. Die unvollständige Anreicherung eines virusadsorbierenden Prinzips aus Erythrozytenstroma ist gelungen (56).

Die Diskussion um die Frage der chemischen Struktur von Haemagglutinin und Rezeptor wurde belebt durch den Nachweis BURNETS (27), daß manche bakteriellen Kulturfiltrate bezüglich ihrer Fermentwirkung gegenüber roten Blutkörperchen sich in nahezu allen Stücken verhalten wie Virushaemagglutinine. Solcherart aktiv sind Präparate aus *V. Cholerae* und das α -Toxin von *Cl. Welchii*; das wirksame Prinzip wird RDE (receptor-destroying enzyme) genannt. Die endgültige chemische Zuordnung der fraglichen Substanzen konnte noch nicht vorgenommen werden (27). Die Annahme, daß es sich um einen mucinähnlichen Stoff bzw. um eine Mucinasen handelt, scheint mit der Mehrzahl der Befunde und Argumente am besten vereinbar zu sein (57, 58, 59). KLENK rechnet die rezeptiven Strukturen an der Erythrozytenoberfläche zu den Verbindungen vom Typ der N-Acetyl-Neuraminsäure (60).

4. Die "unspezifische" Hemmung der Haemagglutination und die nicht virusbedingte Haemagglutination

Um zu weiteren und bestimmteren Aussagen über die chemische Natur der viruspezifisch rezipierenden Körper an Erythrozyten zu gelangen, wurde die Suche nach nicht zellgebundenen, rezeptorähnlichen Substanzen aufgenommen und an ihnen die - für diesen Zweck vorerst allerdings unzulänglichen - biochemischen Methoden der Analyse erprobt.

Von großer Wichtigkeit ist dabei die Feststellung, daß die meisten menschlichen und tierischen Normalseren einen gegen das Virushaemagglutinin gerichteten Hemmstoff enthalten, der thermostabil ist und im übrigen sich in der Auseinandersetzung mit inaktivierenden Agentien verhält wie der viruspezifische Rezeptor der roten Blutzellen. Tatsächlich konnte die Identität dieses "FRANCIS-Inhibitors" mit dem Erythrozytenrezeptor bewiesen werden (vollkommene Übereinstimmung der biologischen und chemisch-physikalischen Eigenschaften) (53, 58, 61, 62). - FRANCIS, BURNET, McCREA u. a. entdeckten weiterhin in Normalseren einer Reihe von Tierarten thermolabile Stoffe, die ebenfalls eine haemagglutininhemmende Wirkung enthalten. Diese Proteide werden von Blutkörperchen adsorbiert und halten engen Kontakt zu den γ -Globulinen (3, 51, 52, 61, 62). In Schleimdrüsensekreten des Menschen (Cervix uteri, Ovarialcysten, Nasensekret, Magenschleim, Tränenflüssigkeit) fand BURNET mucinartige, hemmende Substanzen (58, 65, 66, 67, 68, 69). MORGAN und WADDELL erkannten die inhibierende Aktivität der gereinigten Blutgruppensubstanzen O und A. Virusinfizierte Wirtsgewebe produzieren vielfach - von spezifischen Antikörpern abgesenen - Inhibitoren, die die Haemagglutination stark einschränken (3, 4, 50). Auch im Eiklar ließ sich ein ähnlich gearteter, d.h. dem Zellrezeptor verwandter Hemmstoff nachweisen (63). - Die sog. "Normalkomponente" von KNIGHT, ein hochvisköses, saures (I.P. pH 2,3) und kompliziert aufgebautes Proteid, findet sich in normaler wie in virusinfizierter Hühnereiflüssigkeit (70, 71). STANLEY erkannte bei Studien an der Ultrazentrifuge die "Normalkomponente" in der sog. "leichten Fraktion" S 30 bis S 170) wieder (72). GREEN und WOOLLEY prüften eine Anzahl von Polysacchariden aus höheren Pflanzen und Bakterienkapseln und konnten zeigen, daß auch diese Substanzen (Pektin) die Influenza-Erythrozytenreaktion zu unterdrücken vermögen (3).

Das verbreitete Vorkommen und die Vielfalt der natürlichen Stoffe, welche die Virus-Zell-Reaktion blockieren, indem sie entweder die zellständigen Rezeptoren besetzen oder aber mit dem haemagglutinierenden Prinzip des

Virus eine Verbindung eingehen, macht deutlich, daß es nicht das Privileg der virusspezifischen Antikörper ist, bezüglich des HIRST'schen Phänomens antagonistisch zu wirken. Erinnert man sich überdies der lange bekannten Beobachtung, daß andererseits gewisse Bakterienarten, Samenextrakte sowie Phytagglutinine und andere Agglutinine diverser Provenienz (Allantoissack) ein der Aktivität des Virushaemagglutinins analoges Verhalten zeigen, so rückt notwendigerweise die Sicherung der Spezifität einer festgestellten Erscheinung in unserer Arbeit jeweils an die erste Stelle.

B. DIE ZELLKATAPHORESE

1. Physikalische Voraussetzungen der Zellkataphorese

Den chemischen Veränderungen an der Zellwand entsprechen Veränderungen der physikalischen Eigenschaften. Von diesen können Verschiebungen der elektrischen Oberflächenladung mit Hilfe der zellkataphoretischen Methode quantitativ bestimmt werden (75).

Die exponierten Membranstrukturen der nativen Erythrozyten dissoziieren in Medien annähernd physiologischer H-Ionenkonzentration Kationen im Überschuß ab, sodaß die roten Blutkörperchen als elektrisch negativ geladene Teilchen in der Suspensionsflüssigkeit vorliegen. Die negativen Valenzen der Zelloberfläche ziehen positiv geladene Ionen aus der Umgebung in ihre engere Nachbarschaft und veranlassen so die Ausbildung einer schalenförmigen Doppelschicht. Die nicht abgesättigten (negativ geladenen) Säurereste stellen deren innere Belegung dar, während die aus der Suspensionsflüssigkeit stammenden Kationen in unmittelbarer Nähe der Phasengrenze als schichtartige Verdichtung, mit größerer Distanz von der Zelloberfläche als eine - in ihrer Dichte kontinuierlich abnehmende - "Ionenwolke" von diffuser Beschaffenheit auftreten. Das elektrische Potential fällt nach außen hin asymptotisch ab. - Die Potentialdifferenz zwischen der Zellmembran und der (hypothetischen) Außenfläche der Doppelschicht wird Phasengrenz- oder $\mathcal{E}$ -Potential genannt; der Spannung, die zwischen den negativen Ladungen der Zellmembran und den daran fixierten Kationen einerseits und den in thermischer Bewegung begriffenen, aber elektrostatisch attrahierten Ladungspunkten der Suspensionsflüssigkeit ("Ionenwolke") andererseits herrscht, kommt die Bezeichnung $\mathcal{G}$ -Potential zu. Dieses sog. elektrokinetische Potential hängt von der Elektrolytenkonzentration des Milieus ab. Mit ansteigender Ionenstärke ($\mu = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$, wobei c_i = molarer Konzentration der i-Ionen, z_i = deren Wertigkeit) drängen sich mehr und mehr freie, elektrisch opponente Ionen um den Erythrozyten zusammen: die Zahl der an negative Valenzen gebundenen Kationen nimmt zu, folglich reduziert sich die Gesamtladung der Zelloberfläche und damit das $\mathcal{G}$ -Potential.

Die Zurückdrängung der Säurerest-(COOH)-Dissoziation und die gleichzeitige, dazu streng relative Begünstigung der elektrolytischen Spaltung basischer Gruppen läßt sich - eventuell über den isoelektrischen Punkt des Ladungsausgleichs hinaus - durch Vermehrung der H-Ionen (Säuerung) im Medi-

um erreichen

Im elektrischen Feld der Stärke E erfährt jedes Blutkörperchen, dessen Oberflächenladung den Betrag q hat, eine gerichtete Kraft $K = qE$; es bewegt sich mit der von K abhängigen Geschwindigkeit v nach dem seiner elektrischen Ladung gegensätzlichen Pol. Die Maßzahl der Größe v bleibt trotz der dauernd wirksamen Feldkraft konstant, da die Reibungskraft $R = 6\pi\eta r v$ (STOKE; wobei η = Viskosität der Suspensionsflüssigkeit, r = Radius des Erythrozyten. Die Zelle wird hier als ideal kugelförmig behandelt) alsbald auf den Wert der elektrischen Kraft K anwächst. Es gilt demnach:

$$6\pi\eta r v = qE \quad (1); \quad v = \frac{qE}{6\pi\eta r} \quad (2).$$

Es lassen sich nun aber auf den eine oberflächliche elektrische Ladung führenden Erythrozyten alle gedanklichen und rechnerischen Operationen anwenden, die einen Kugelkondensatoren betreffen.

Die Kapazität eines Kugelkondensators bemißt sich nach der Formel:

$$C = \frac{q}{\varphi} = 4\pi\epsilon\epsilon_0 r \quad (3),$$

wobei ϵ_0 die Influenzkonstante ($8,8 \cdot 10^{-11}$ Amp.sec / Volt meter), ϵ die Dielektrizitätskonstante der umgebenden Flüssigkeit bedeutet. Man erhält in Verknüpfung der Gleichungen (2) und (3) die folgende Abhängigkeit:

$$v = \frac{2}{3} \frac{\epsilon\epsilon_0 \varphi}{\eta} E \quad (4).$$

Wird nun die elektrokinetische Mobilität b als die auf die Einheit der Feldstärke E bezogene tatsächlich gemessene Geschwindigkeit v verstanden

$$(b = \frac{v}{E} \quad (5),$$

dann gilt ferner:

$$b = \frac{2}{3} \frac{\epsilon\epsilon_0 \varphi}{\eta} \quad (6).$$

Es ist demnach die elektrische Beweglichkeit des Erythrozyten direkt proportional dem elektrokinetischen Potential und der Dielektrizitätskonstanten und invers proportional der inneren Reibung der suspendierten Phase, die ihrerseits sich mit der Temperatur ändert.

Es sei angemerkt, daß die elektrische Doppelschicht hinsichtlich der Individualität der beteiligten Kationen eine stete Umwandlung durchmacht. Die in der "Ionenwolke" mitgeführten positiven Ionen werden nämlich ständig gegen

den negativen Pol hin "abgetrieben", indem sie sich aus dem Schwarzin (an dessen katodischem, ausgezogenem Ende) lösen. Der Erythrozyt vervollständigt jedoch seine Ionennülle unter fortgesetzter Einbeziehung der zur Kathode und mithin ihm entgegen strebenden, der Suspensionslösung angehörigen Kationen. (Bei Einstellung des Milieus auf den pH-Wert, der dem I. P. der Erythrozyten entspricht, kommt es nicht zur Ausbildung einer "Ionenwolke"; herrscht eine höhere als die ladungsausgleichende H-Ionenkonzentration, so gilt - bei Umkehrung aller Vorzeichen - das oben gesagte).

Zur praktischen kataphoretischen Messung dienen allseitig geschlossene, (meist) quaderförmige Kammern, an die ein wohldefiniertes elektrisches Feld angelegt werden kann. Die Teilchenbewegung wird mit Hilfe eines Mikroskops beurteilt.

Die einfache, direkte Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit von Erythrozyten identischer Provenienz ergibt keineswegs die gleichen Werte, wenn die Objektbeobachtung in verschiedener Kammertiefe vorgenommen wird. (Dabei stimmen die Einzelresultate, sofern die Einstellung des Mikroskops unverändert bleibt, sehr gut überein.) Die unmittelbar zugängliche Blutkörperchenmobilität erweist sich vielmehr als eine Funktion des Meßabstandes von der Außenbegrenzung der flüssigen Phase, und zwar wird die Geschwindigkeitsverteilung im Raum mathematisch von einer Parabel repräsentiert (Fig. 1). Auf die im elektrischen Feld anodisch wandernde rote Zelle scheint demnach eine zusätzliche Kraft einzuwirken, die im mittleren Kammerbereich die Erythrozytenbewegung fördert, in den Randzonen dagegen keinen oder entgegengesetzten Einfluß hat. - Tatsächlich tritt in einer Glaskammer eine erhebliche Flüssigkeitsströmung auf. Da die Meßzelle geschlossen konstruiert ist und folglich die reziprok transportierten Flüssigkeitsvolumina sich entsprechen müssen, das oben erwähnte Schaubild (Fig. 1) aber eine regelmäßige Gestalt mit einem einzigen Scheitelpunkt zeigt, kommt für die Strömung des Mediums in der Kammer (bei angelegtem elektrischem Feld) nur der ebenfalls in Fig. 1 wiedergegebene Verlauf in Frage: nahe der Kammerwand fließt die Suspensionslösung mit Richtung auf die Kathode, in der Tiefe der Kammer zur Anode.

Diese Verhältnisse bedingen die Existenz zweier sog. "stationärer Ebenen", d.h. für jede Meßkammer lassen sich zwei Beobachtungstiefen festlegen, in denen das Medium steht und die Bestimmung der wahren Wanderungsgeschwindigkeit einer einzelnen Blutzelle direkt möglich ist. - Die Ery-

throzytengeschwindigkeit (v_m), die entlang einer nicht in diesen Ebenen liegenden Meßstrecke ermittelt wird, stellt die algebraische Summe der Geschwindigkeit relativ zur Flüssigkeit (v_w) und der Geschwindigkeit der Flüssigkeit gegenüber der Glaswand (v_f) dar:

$$v_m = v_w + v_f.$$

Die Größe v_w bedeutet die wahre Wanderungsgeschwindigkeit des Erythrozyten. Integriert man über der Kammertiefe d , so ist

$$\int_0^d v_m dx = \int_0^d v_w dx + \int_0^d v_f dx.$$

Insgesamt findet in der Kammer kein nach einem der beiden Pole gerichteter Flüssigkeitstransport statt (s. o.); die Vektorsumme der Geschwindigkeiten ist deshalb: null. v_w stellt für die untersuchte Erythrozytenart eine Konstante dar. Also gilt:

$$\int_0^d v_m dx = v_w \int_0^d dx = v_w d; \quad v_w = \frac{1}{d} \int_0^d v_m dx.$$

SMOLUCHOWSKI (74) legte die für die laminare Strömung visköser Flüssigkeiten gültigen Regeln seiner Errechnung der idealen Meßtiefe zugrunde und kam auf 0,211d bzw. 0,789d (d = Kammertiefe).

Die physikalischen Gesetzlichkeiten, die dem in einer - wegen des geringen Arbeitsabstands des Mikroskops - engen Kataphoresekammer befindlichen und einem elektrischen Feld ausgesetzten Suspensionsmedium diesen charakteristischen, unvermeidlichen Kreislauf aufzwingen, können noch nicht als endgültig erkannt und verbindlich formuliert betrachtet werden. Im allgemeinen wird zur Erklärung des Phänomens die COEHN'sche Regel angeführt, die besagt, daß schlecht leitende Stoffe sich nach Maßgabe des aus ihren Dielektrizitätskonstanten gebildeten Quotienten gegeneinander elektrisch aufladen und an der Phasengrenze eine Doppelschicht etablieren. Das Wasser ($\epsilon = 81$), Trägersubstanz sowohl der Ionen als auch der Erythrozyten, verhält sich darnach wie ein positiv geladener Körper und bewegt sich im elektrischen Feld nach der Kathode, und zwar - mit allen oben besprochenen Folgen - entlang der Glaswandung ($\epsilon = 5 - 10$). - Ferner sollen freie negative Valenzen an der Glasoberfläche für eine solche elektroendosmotische Flüssigkeitsströmung von Bedeutung sein, doch liegen auch zu dieser Angabe keine quantitativen Feststellungen vor.

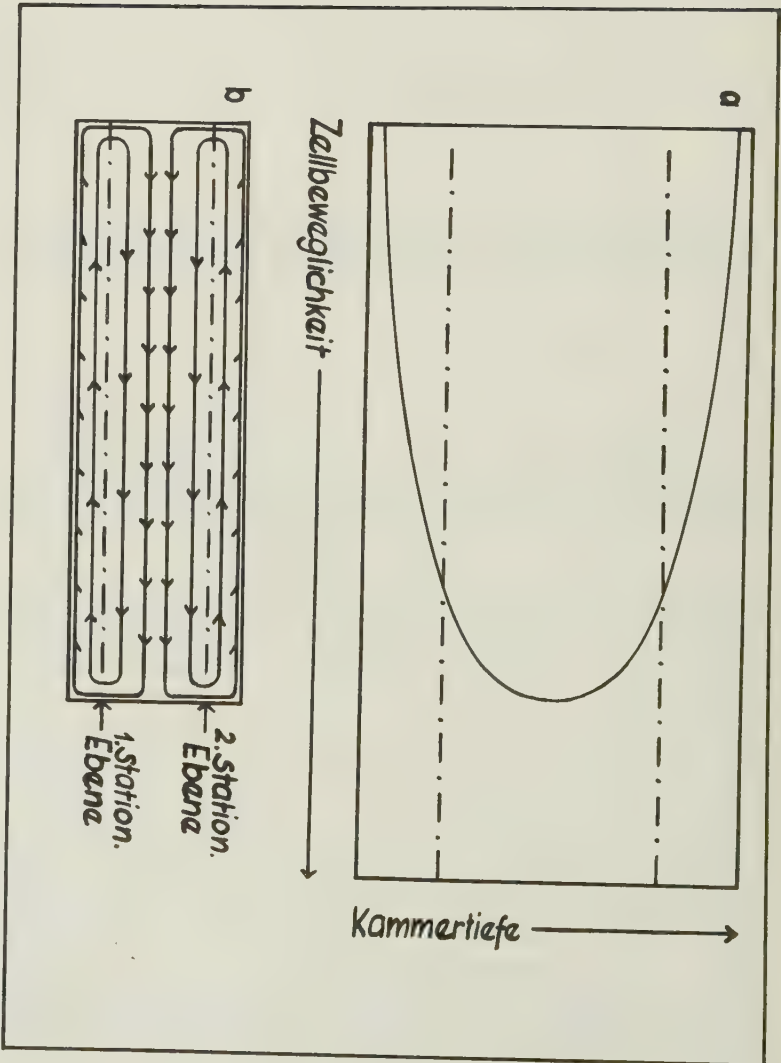


Fig. 1: Physikalische Voraussetzungen der Zellkataphorese. a) Die kataphorese Bewegung oberflächlich geladener Erythrozyten als Funktion des Abstandes der Meßebene von der Kammerwand.

b) Der elektroosmotische Flüssigkeitstransport in einer gläsernen Zelle bei angelegtem elektrischen Feld.

2. Beschreibung der Apparatur

An dem oben gezeichneten Aufriß der theoretischen Grundlagen lassen sich im wesentlichen die Vorschriften ableiten, die bei Konstruktion und Anlage einer leistungsfähigen Kataphoreseapparatur beachtet werden müssen. Vielfältige, in etwa zwei Jahrzehnten gesammelte Erfahrungen regten - seit dem Bau der ersten brauchbaren Kammer mit laminarer Strömung durch ABRAMSON (1942) (75) - die Experimentatoren immer wieder zu Verbesserungen der Meßvorrichtung an (ALEXANDER und SAGGERS (1948) (76); PONDER (1951) (77); RUHENSTROTH-BAUER und PIPER (1956) (78)). - Zur Ausführung der vorliegenden Untersuchungen diente das im folgenden beschriebene Gerät. Es wurde - unter Veränderung einiger Einzelheiten (z.B. streng symmetrische Anordnung der Bauelemente) - nach den Angaben von RUHENSTROTH-BAUER und PIPER (78) konstruiert.

Das zur Aufnahme des Untersuchungsgutes eingerichtete, im ganzen röhrenförmige Glasbehältnis ist in seinem mittleren Abschnitt als flache Cuvette ausgebildet, um zu gewährleisten, daß hier, im Blickfeld des Beobachters, die oben aufgewiesene elektroosmotische Flüssigkeitsumwälzung unter übersichtlichen und kontrollierbaren Bedingungen vonstatten geht. Die Wände dieser Kammer sind planparallel gefügt und aus Glas von guten optischen Eigenschaften gefertigt. Die Cuvette umschließt einen spaltförmigen Raum; das bedeutet, daß die Strömung des Suspensionsmediums entlang der schmalen Glasflächen gegenüber dem Flüssigkeitstransport entlang der breiten Glasflächen vernachlässigt werden kann. Die Tiefe der Meßzelle (Richtung der mikroskopischen Achse) beträgt 646μ , ihre Höhe $11\ 390\mu$, ihre Länge (Richtung der Meßstrecke) $40\ 000\mu$.

(Fig. 2:) Die Glasröhren (a), welche sich der Kammer (B) bei Durchgängigkeit der Lumina seitlich anschließen, münden je in einen 120° -Dreiwegehahn (C); dieser gestattet einmal, über ein kurzes Zwischenstück (D) eine Kommunikation der Meßzelle mit dem Elektrodengefäß seiner Seite (E) herzustellen, zum anderen erlaubt er, die Kammer für die Beschickung von außen zugänglich zu machen. - Die Elektrodengefäße enthalten gesättigte Kupfersulfatlösung und sind an ihrer kammerfernen Öffnung durch Gummistopfen (F) verschlossen. Kupferstäbe (G) tauchen in die Kupfersulfatlösung ein und bieten an ihrem freien Ende den Stromanschlüssen (H) Kontakt. Gegen den Dreiwegehahn bzw. die Cuvette hin wird die Elektrodenflüssigkeit durch Gipsplombe (I) und Agarplombe (K; in D) abgeschirmt.

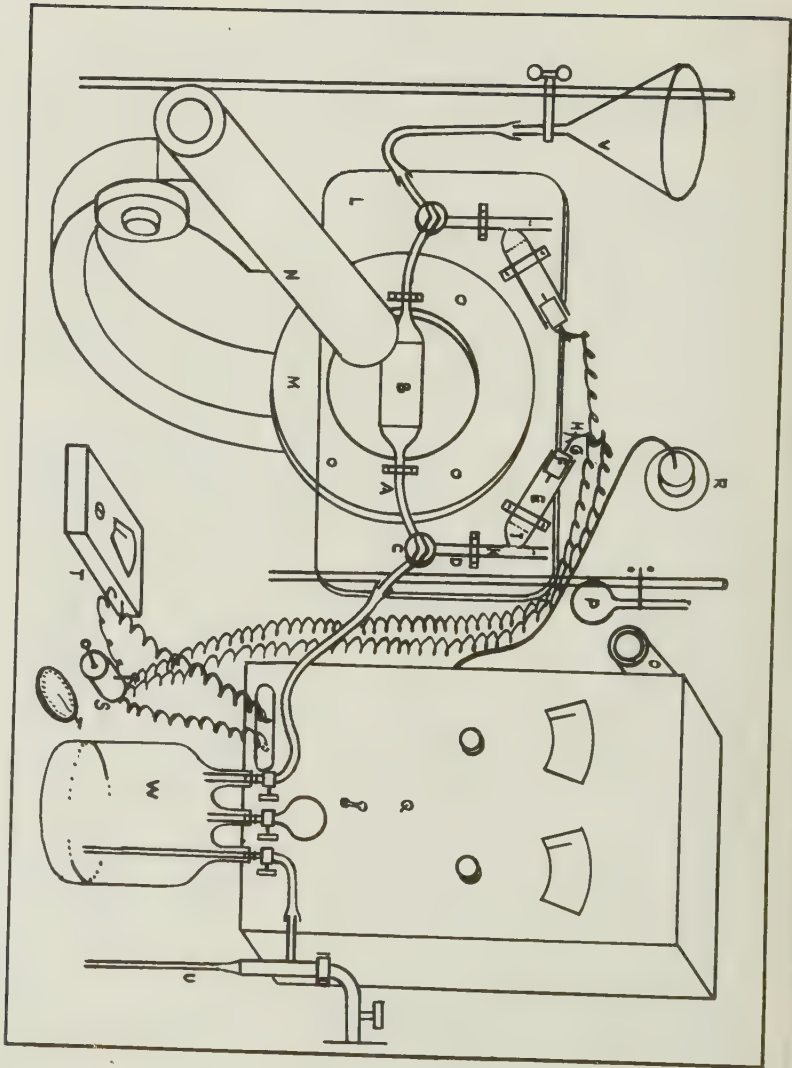


Fig. 2: Die Kataphorese-Apparat. (Erläuterungen im vorstehenden Text)

Das System ist an einer Plexiglasplatte (L) befestigt, welche ihrerseits am Kreutztisch des Mikroskops (M) angeschraubt werden kann. Der Tubus (N), dessen Achse waagrecht steht und nach dem Mittelpunkt der Kammerdeckplatte zielt, ist mit einem LEITZ-Objektiv A = 0,25; 10 : 1 und einem LEITZ-Periplanokular 25 x B; mit Meßgitter ausgestattet. - Das Gegenlicht einer Mikroskopierlampe (O) wird, bevor es auf die Meßkammer fällt, durch eine mit MOHR'scher Salzlösung gefüllte Glaskugel (P) geführt, um die Wärmestrahlung auszuschalten.

Den zum Aufbau des elektrischen Feldes benötigten Gleichstrom liefert ein Transformator (Q), der an das Lichtnetz (R) angeschlossen ist. Mit Hilfe eines Wendeschalters (S) kann die Richtung des Stromflusses umgekehrt werden. Ein Ampèremeter (T) dient zur Regulierung des elektrischen Feldes, das nach der OHM'schen Beziehung berechnet wird:

$$X = \frac{I}{q \cdot \mathcal{K}} ; \quad \begin{array}{l} X = \text{Feldstärke;} \\ I = \text{Stromstärke;} \\ q = \text{Querschnittsfläche der Cuvette, senkrecht zu den} \\ \quad \text{Feldlinien genommen;} \\ \mathcal{K} = \text{elektrische Leitfähigkeit des Suspensionsmediums.} \end{array}$$

3. Meßtechnik, Fehlerquellen und Fehlerbreite der zell-kataphoretischen Methode

Die beschriebene Kataphorese-Anlage (Fig. 2) weist mit den zur Isolierung der Elektrodenflüssigkeit vorgesehenen Gips- und Agarplomben solche Teile auf, die nach bestimmten Fristen erneuert werden müssen, weil sie den Dilutions- und Diffusionskräften der Kupfersulfatlösung nur bedingten und zeitlich begrenzten Widerstand entgegenzusetzen vermögen. (Selbst vereinzelte ins Kataphoreserohr (Cuvette) gelangte Cu- und SO_4 -Ionen entfalten eine merkbare und durchaus unerwünschte Wirkung auf das Untersuchungsgut.)

Um den vergleichsweise resistenten Gipspfropf (I) anzubringen - er kann während 4 Wochen in Position belassen werden; seine fortschreitende Erweichung gibt sich durch zunehmende Blaufärbung (zuerst seiner kammerfernen Partien) zu erkennen - ist zunächst ein gerollter Papierstreifen (provisorisch) in das Zwischenstück (D) einzulegen; dadurch wird die kleine Menge Gips, die man über der kammernahen Öffnung des Elektrodengefäßes (E) anfüllt, am Durchfallen in die angeschmolzene Röhre (D) gehindert. Für die Dauer dieses Arbeitsganges stellt man zweckmäßigerweise durch Drehung

des Kreutztisches (M) in der Ebene die Elektrodengefäße senkrecht. - Während einige Tropfen aufgebracht Leitungswassers in den Gips einsickern, muß durch vorsichtig mit der Hand ausgelöste Erschütterungen dafür gesorgt werden, daß entstehende Hohlräume alsbald wieder verschwinden. - Nach einigen Stunden erweist sich die Gipsplombe als hart. Nun wird das gesamte System - einschließlich der zur späteren Aufnahme der Kupfersulfatlösung bestimmten Röhren (E) - mit Na_2SO_4 -Lösung gefüllt und während 2 Stunden mit einem elektrischen Strom der Stärke 10 mA belastet. (Diese Maßnahme verhindert Schwankungen des Stromflusses beim Messen.)

Vor jeder einzelnen routinemäßigen Kammerfüllung müssen die Agarplomben (K) frisch gesetzt werden, indem man mittels einer Spritze eine etwa 2%ige, heiße Agarlösung in die sorgfältig gesäuberten und getrockneten Zylinder (D) gibt; dies geschieht bei blinder Stellung der Dreiwegehähne. Es ist darauf zu achten, daß nicht Luftblasen, die sich insbesondere an der Öffnung zur Hahnbohrung leicht festsetzen, in der rasch erkaltenden Agarplombe zurückbleiben und so die Kontinuität des elektrischen Leiters zwischen Elektrodenflüssigkeit mit eingetauchten, stromzuführenden Kupferstäben einerseits und Suspensionsflüssigkeit andererseits nicht zustande kommen lassen. (Inkonsistente und geschrumpfte (alte) Agarplomben geben u.U. dem hydrostatischen Druck der zur Messung eingebrachten Erythrozytensuspension nach oder verdrängen ihrerseits das im Kataphoreserohr befindliche Material; die dadurch bedingten unkontrollierbaren Flüssigkeitsverschiebungen können das Meßergebnis erheblich verfälschen. - Um störende Diffusionsbewegungen zu vermeiden, wird die Agarlösung stets unter Verwendung der Flüssigkeit bereitet, in der auch die zu prüfenden roten Blutkörperchen aufgeschwemmt sind.)

Bevor die Kataphoresezelle mit dem Untersuchungsgut beschickt werden kann, muß sie einer äußerst gründlichen Reinigung unterzogen werden. Zu diesem Zweck wird (bei provisorisch eingesetztem Dreiwegehahn) nacheinander mit Leitungswasser, Aether, Alkohol, Prillösung, Leitungswasser und aqua bidestillata gespült. Es lassen sich diese "Putzmittel" mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe (U), die im übrigen auch dazu dient, die Erythrozytensuspension aus einem Glastrichter (V) über einen Schlauch in das System einzusaugen, an die inneren Glasflächen der Kammer heranbringen. Anschließend wird die Cuvette im Luftzug der Wasserstrahlpumpe getrocknet; hartnäckige Verunreinigungen können so entdeckt und mittels Säure zum Verschwinden gebracht werden. (Spuren der Säure, die eventuell über Nacht in der Kammer stehen bleiben muß, gefährden vermöge ihrer Wirkung sowohl auf die Blutkörper-

chen als auch auf die Suspensionsflüssigkeit (Ionie; pH-Wert) die Zuverlässigkeit des Meßergebnisses und sind deshalb zu entfernen.)

Es ist erforderlich, die Dreiwegehähne (C) täglich zu fetten. Man geht dabei so vor, daß zunächst die geschliffenen Flächen mit Aether abgerieben und getrocknet werden. Dann bestreicht man den Konus hauchdünn mit Vaseline und setzt ihn vorsichtig in die Bohrung ein; Luftblasen im Kapillarspalt zwischen den Kontaktflächen dürfen nicht entstehen. Sollte überschüssig aufgetragene Vaseline in die Cuvette eingeschwemmt worden sein, so muß die Verschmutzung auf dem Wege der Lösung in Aether beseitigt werden.

Die Vorbereitung der elektrischen Anlage zum Einsatz besteht darin, die Klemmkontakte (H) an den Kupferstäben (G) zu fixieren und die elektrischen Meßgeräte (Ampèremeter (T), Voltmeter des Transformators (Q) hinsichtlich der Stöpselung sowie der Nullregulierung der Zeiger zu überprüfen. Die Mikroskopierlampe (O) wird eingeschaltet.

Ferner versichert man sich, daß die Kammer unverrückbar und genau waagrecht am Kreutztisch (M) festsetzt und die Gummischläuche sowie die Elektrodengefäße dirhthalten. In die zwischen Wasserstrahlpumpe und Kammer angeordnete WOLFF'sche Flasche (W) wird, falls mit infektiösem Material gearbeitet werden soll, ein Desinfektionsmittel gegeben.

Anschließend bringt man den Tubus (N) in Stellung. Nach einer letzten Spülung der Maßkammer mit der Lösung, die auch zur Bereitung der als Untersuchungsmaterial anstehenden Zellaufschwemmung herangezogen worden ist, wird die Erythrozytensuspension eingesaugt; Luftblasen dürfen dabei nicht in das Kataphoreserohr gelangen. - Eine entsprechende Drehung an den Dreiwegehähnen schafft der Elektrizität einen geschlossenen Leiterkreis, der beim Wendeschalter (S) unterbrochen werden kann. - Zweckmäßigerweise nimmt man die zu- und ableitenden Schläuche von den Stutzen des Kataphoreserohres, um den hydrostatischen Druck bzw. Sog auf den Kammerinhalt, welchen die über den Kapillarspalt der Hahnbohrung mit dem Cuvettenlumen kommunizierenden Flüssigkeitssäulen auszuüben imstande sein könnten, auszuschalten.

Zuletzt wird unter Betätigung des Feintriebs am Schlitten des Mikroskops, ausgehend von einer Marke an der Kammerdeckplatte, die stationäre Ebene aufgesucht. - Die Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit deutlich konturierter Erythrozyten im elektrischen Feld wird nun so vorgenommen, daß man die Zellen in beiden Richtungen (Umpolen der Spannung) über gleiche Strecken bewegt, die insgesamt benötigte Zeit mit einer Stoppuhr mißt und auf die zurückgelegte Distanz bezieht.

Außer jenen Ursachen zu Meßfehlern, die als unsachgemäße Handhabung der Apparatur oder als Zufälle bei der Abwicklung des vorstehend geschilderten "Rituals" zu verstehen und grundsätzlich vermeidbar sind (s.o.), eignen der zellkataphoretischen Methode solche Fehlerquellen, die in den physikalischen Gegebenheiten des Verfahrens begründet liegen:

Der Elektrizitätsfluß bewirkt im Leiter eine Aufheizung, die von der Stromstärke und der Beschaffenheit des Mediums abhängt. Die - entsprechend diesem Gesetz - in der Suspensionsflüssigkeit nach Anlegen einer Spannung hervorgerufene JOUL'sche Wärme führt u.U. zu Konvektionsströmungen, die das Meßergebnis verfälschen und sich in je nach Polung unterschiedlichen Werten für die Erythrozytenmobilität verraten. (Diese Flüssigkeitsbewegung kann durch günstige Wahl des Suspensionsmediums eingeschränkt werden; nach längerer Praxis wurde sie nicht mehr beobachtet. Tatsächlich treten die von der wärmebedingten Ausdehnung des Kammerinhaltes herrührenden unregelmäßigen Flüssigkeitstransporte bei ungleichmäßiger Wärmeableitung auf.) - Die Wärmestrahlung der Mikroskopierlampe wird im Wärmefilter absorbiert und auf diese Weise daran gehindert, ähnliche Folgen zu zeitigen.

Einen weiteren die Meßgenauigkeit vermindernenden Faktor stellt die dimensionierte Schärfentiefe der Optik dar, denn auch die durchaus scharf erscheinenden Blutkörperchen - nur solche dürfen geprüft werden - liegen nicht durchweg in einer Ebene, sondern halten sich innerhalb eines flachen zylinderförmigen Raumes auf. Der dadurch bedingte Fehler kann nur statistisch ausgeglichen werden.

Die Schweresedimentation führt die Beobachtungsobjekte bei vertikaler Kammermontierung (s.o.) - im Unterschied zur "horizontalen Messung" - nicht aus der SMOLUCHOWSKI'schen Ebene heraus; immerhin veranlaßt eine nicht ganz gleichmäßige Zellverteilung (größere und kleinere bzw. kompaktere und ausgebreitetere Agglutinate) wegen der differenten Absinkgeschwindigkeit der Körperchen die Entstehung "lokaler Wirbel". Letztere fallen jedoch kaum ins Gewicht.

Ein weiterer methodischer Fehler ist stets in der Zeitnahme zu vermuten. Bei nicht zu hoher Zellgeschwindigkeit und einiger Übung kann allerdings der Zeitpunkt, zu dem ein Erythrozyt die Streckenmarke (im Meßgitter) passiert, exakt gestoppt werden.

Die Streuung aller Meßwerte, die etwa bei der Prüfung homogenen, nicht vorbehandelten Zellmaterials gewonnen worden sind, läßt zunächst kein

sicheres quantitatives Urteil über den apparativen Fehler überhaupt zu, da die elektrischen Oberflächeneigenschaften verschiedener Erythrozyten wahrscheinlich (in engen Grenzen) differieren und auf die natürliche Variabilität dieser Qualität wohl nicht von den Verhältnissen, wie sie für andere Charakteristika (z.B. die Größe) gelten, geschlossen werden darf.

Die in Fig. 3 für 260 Einzelmessungen bzw. 26 Kammerfüllungen aufgezeichnete Verteilungskurve macht anschaulich, daß diese Unterschiede jedenfalls gering sind. - Der Sigma-Wert der im Schaubild zusammengefaßten Meßreihe beträgt $\pm 1,86 \%$.

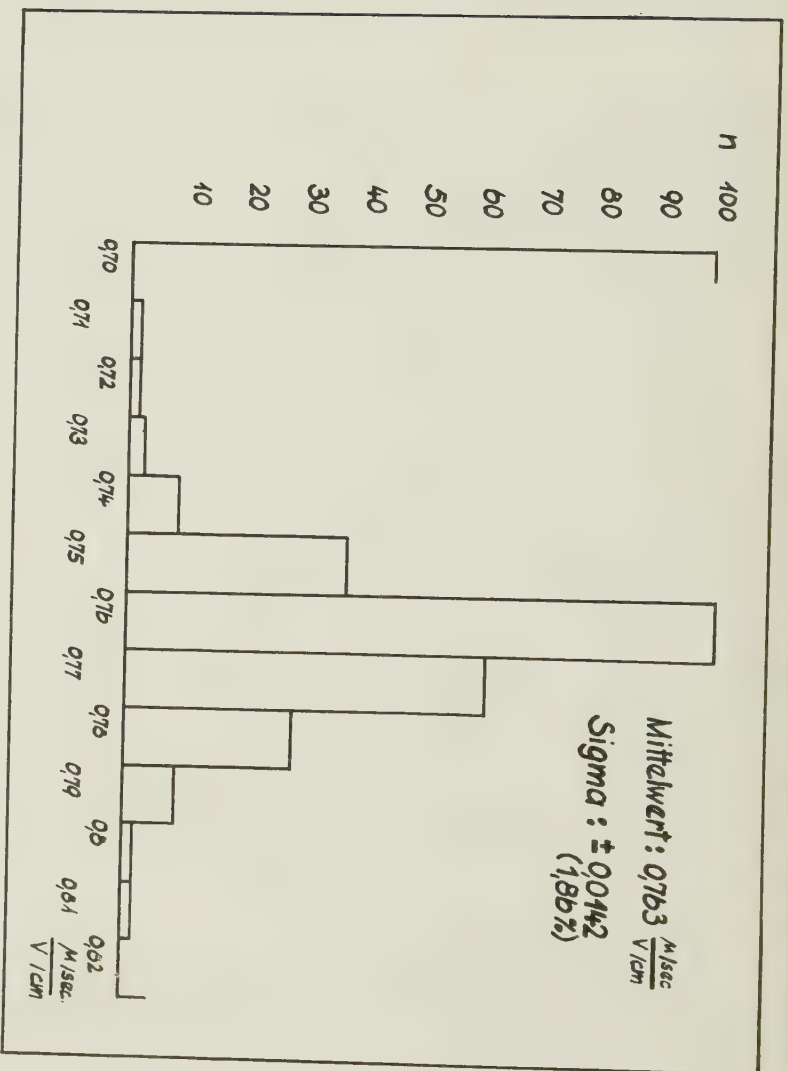


Fig. 3: Verteilungskurve zur Beurteilung der methodischen Fehlerbreite beim routinemäßigen Einsatz der Kataphorese-Anlage

Zweiter Teil

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

C. DIE FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

Es war unsere Aufgabe, nach allen jenen Wirkungen des Virus an der Erythrozytenoberfläche, die elektrophoretisch faßbar sind, zu suchen und sie in qualitativer und quantitativer Hinsicht zu klären.

Die kataphoretische Meßkammer dem Virologen als ein ausgezeichnetes Werkzeug vorgeschlagen und an die Hand gegeben zu haben, ist das Verdienst von MARTIN HANIG; seine Publikation "Electrokinetic changes in human erythrocytes during adsorption and elution of PR 8 influenza virus" (79), eine erste Demonstration der Leistungsfähigkeit kataphoretischer Methoden zur Erforschung der von Virus verursachten biologischen Vorgänge an der Zelloberfläche, blieb bis heute die wichtigste Untersuchungen auf diesem Gebiet. - HANIG fand, daß die Reaktion des Virushaemagglutinins mit dem spezifischen Rezeptor die negative Überschußladung an der Zellmembran vermindert. Die Reduktion beträgt bei Einwirkung von PR 8 Influenzavirus auf humane Erythrozyten der Blutgruppe O oder AB etwa 60 % des ursprünglichen Wertes. Dieser - nach ADA (80) bei Behandlung einer bestimmten Erythrozytenart für jede Virusart charakteristische - Endwert der elektrischen Oberflächenladung (und damit der elektrophoretischen Beweglichkeit) wird nach zureichenden Fristen stets erreicht und ist unabhängig von der zugesetzten Virusdosis; HANIG stellte jedoch weiterhin fest, daß die Veränderung bei höherer Viruskonzentration schneller voranschreitet als bei geringerer Virusdichte. Diese Verhältnisse wurden vom Untersucher so gedeutet, daß (liberierte) Viruspartikel immer wieder an bis dahin noch intakten Rezeptoren fermentativ angreifen und auf diese Weise allmählich - bei geringer Zahl der Virusteilchen in einer verhältnismäßig langen Zeitspanne - alle rezeptiven Strukturen abbauen.

Die vorliegende Arbeit besitzt im Resultat des HANIG'schen Experiments einen wesentlichen Ansatzpunkt. - Da bisher nur mit solchem Virus gearbeitet worden war, das der Zellaußenwand nicht fest anlagerte, nun aber die Einleitung der Reaktion zwischen dem fest an der Erythrozytenmembran haftenden Virus und seinem spezifischen Antikörper sowie die kataphoretische Prüfung dieses Vorgangs versucht werden sollte, war zunächst zu untersuchen, ob die irreversible Fixation von Virus an die Rezeptoren eine

von der natürlichen Mobilität verschiedene, kennzeichnende, dem Ausmaß der Vorbehandlung mit Virus quantitativ entsprechende und unveränderliche elektrophoretische Zellbeweglichkeit bedeutet. Später war der Frage nachzugehen, ob das unlösbar an die Erythrozytenoberfläche adsorbierte, inaktivierte Virusteilchen virusspezifische Antikörper zu binden vermag, und ob dies ohne Abspaltung der Viruspartikels von der Zellmembran geschieht. Endlich war zu prüfen, ob der Erythrozyten-Virus-Antikörper-Verband, falls ein solcher sich hat aufbauen lassen, vom Zell-Virus-Komplex kataphoretisch unterschieden werden kann.

D. MATERIAL UND METHODEN

1. Das Ausgangsmaterial und seine Gewinnung

a) Die Suspensionsflüssigkeit

Da die H-Ionenkonzentration des Suspensionsmediums, deren ursprüngliche Höhe sich durch die Einbringung der Zellen, der übrigen Reaktionspartner (Virus, Antikörper) sowie aller Begleitsubstanzen ändern würde, die tatsächlich gemessene Erythrozytenbeweglichkeit maßgeblich beeinflusst, wurden, um die erhaltenen Resultate mit Sicherheit auf den pH-Wert des Milieus beziehen zu können, durchweg gepufferte Lösungen (isotonische Veronal-Acetat-Gemische) verwendet. Nach den Vorschriften von MICHAELIS läßt sich der Säuregrad dieser Flüssigkeiten variieren, ohne daß eine nennenswerte Streuung der Ionenstärken innerhalb einer Pufferreihe auftritt (für den MICHAELIS-Stammpuffer beträgt die Ionenstärke $\mu = 0,15$; die Ionen sind einwertig.)

Um die Entstehung von JOUL'scher Wärme beim Stromfluß einzuschränken (s.o.), ferner um gewisse Erscheinungen in einem Milieu wechselnder Elektrolytenkonzentration beobachten zu können, wurde die Pufferlösung mit isotonischer (5,4 %iger Glukoselösung) versetzt. Als "Standardlösung" galt eine im Verhältnis 1:3 angesetzte Mischung der Ionenstärke $\mu = 0,0375$.

Zur Herstellung der Suspensionsflüssigkeiten ist nur "Glukose reinst" geeignet; ihre Auflösung - wie auch die der Elektrolyten - muß in CO₂-freier, d.h. gekochter aqua bidestillata erfolgen. - Die MICHAELIS-Puffer wurden, wenn möglich, unmittelbar vor Gebrauch frisch bereitet, anderenfalls in gefrorenem Zustande gehalten (zur Vermeidung bakterieller Verunreinigungen). - Die Suspensionsflüssigkeiten wurden vor ihrer Verwendung im pH-meter der Fa. PUSL bzw. in der Meßbrücke der Fa. PHILIPS auf H-Ionenkonzentration und elektrische Leitfähigkeit (Ionenstärke) geprüft.

b) Das Zellgut

Zu den Versuchen wurden im allgemeinen Hühnererythrozyten verwendet. - Das native Hühnerblut fließt aus den vom Schlächter mit einem Schnitt eröffneten Carotiden in die bereitgestellten 25 ml-Alseverlösung enthaltenen 50 ml-Glaskolben. Die Blutkonserven werden bei 4 ° C im Kühlschrank

aufbewahrt, und zwar nicht länger als 14 Tage; obwohl Hühnererythrozyten ausnehmend haltbar sind und bei Lagerung in Alseverlösung und eigenem Plasma über einen erheblich größeren Zeitabschnitt hinweg unversehrt bleiben, wurden stets frische Zellaufschwemmungen gebraucht.

Zum Experiment wurden die roten Blutkörperchen meistens in suspendiertem Zustande herangezogen. Vor ihrer Verteilung im Medium (0,85 %ige Kochsalzlösung, isotonische Pufferlösung bei der kataphoretischen Messung, u.a.) erfolgte 3malige Waschung der Zellen in 0,85 %iger Kochsalzlösung.

- Die Einstellung der Suspension auf die vorgesehene Zelldichte muß sehr sorgfältig geschehen. Nach dem üblichen Verfahren wurden die Erythrozyten in der Zentrifuge bei 1500 g und einer Laufzeit von 3 min. zu einem kompakten Sediment abgeschleudert und die "getrockneten" Zellen im bestimmten Verhältnis in der Suspensionsflüssigkeit verdünnt bzw. aufgewirbelt. - Erythrozyten, die länger als 8 std. von Alseverlösung und eigenem Plasma abgetrennt waren, wurden nicht verwendet.

c) Das Viruspräparat

Der Erreger der klassischen Hühner-(Geflügel-)pest (fowl plague disease) bot sich wegen verschiedener, weiter unten eingehend zu besprechender Eigenschaften als günstiges Studienobjekt und Modellvirus an.

Das Krankheitsbild der Hühnerpest wurde zuerst von PERRONCITO, der die "europäische" ("klassische") noch nicht von der "asiatischen" Form unterschied, im Jahre 1878 beschrieben. - Während die Seuche in Asien und Afrika weit verbreitet ist und etwa in Ägypten ständig herrscht, tritt sie in Europa und Amerika zwar immer wieder, jedoch in größeren zeitlichen Abständen und geographisch lokalisiert auf (z.B. in Braunschweig 1901; in USA 1925 - 27; als Panzootie in Deutschland 1941).

Die Empfänglichkeit der anfälligen Geflügelart ist eine absolute. Die Übertragung des bezüglich seiner Virulenz sehr "launischen" Erregers, der verhältnismäßig spät als ein Virus erkannt wurde und Resistenz bewirkt, geschieht über Nasenschleim, Kot, Blut und vielleicht Schmarotzer vornehmlich auf kleinste Hautverletzungen.

Die klinische Diagnose der klassischen Geflügelpest stützt sich auf die Feststellung folgender Kardinalsymptome, die durchweg auf die gefäßschädigende Wirkung des Erregers zurückgeführt werden: hohes Fieber (43 - 44 °C); blau-rote bis schwarze Verfärbung von Kamm und Kehllappen; Austritt rötlich-grauen Schleims aus dem Schnabel; ataktische Kopfbewegungen; schwere Stö-

rungen der **Atmungsfunktion**er (Röcheln); enzephalitische Erscheinungen. - Die Inkubationszeit der (nach 4 - 5 Tagen) fast ausnahmslos tödlich endenden Geflügelseuche beträgt 1 - 5 Tage. Bemerkenswert ist eine deutlich ausgeprägte Virämie. - Differentialdiagnostisch kommen die Cholera, die Laryngotracheitis sowie vor allem die Pseudopest (asiatische Geflügelpest, DOYLE'sche Krankheit, New Castle disease, atypische Hühnerpest, Pneumo-Encephalitis avium) in Frage. - Charakteristisch für die klassische Geflügelpest ist die ausnehmende Anpassungsfähigkeit an einen Wirt: nicht selten beschränkt sich die Erkrankung auf eine einzige Geflügelart, obwohl (z.B. auf einem Bauernhofe) eine allgemeine Ansteckungsmöglichkeit besteht. (Empfänglich ist normalerweise alles Geflügel; Säuger werden nie befallen). - Das hier verwendete Virus hatte sich im Laufe der Brut-eierpassagen an das embryonale Hühnergewebe derart adaptiert, daß es sich gegenüber ausgewachsenen Tieren praktisch apathogen verhielt. - Für die entgegenkommende Überlassung des infektiösen Stainmaterials danken wir Herrn Prof. SCHÄFER, Direktor des MAX PLANCK-Instituts für Virusforschung in Tübingen.

Fast alle Informationen über die spezielle Morphologie und Biologie des Virus der klassischen Hühnerpest (K.P. Virus) gehen derzeit auf SCHÄFER, MUNK, ZILLIG (81) zurück. Von diesen Autoren wurde eine detaillierte Charakterisierung dieser Virusart vorgenommen. Danach konstituieren sich im K.P. virusinfizierten Gewebe als (zunächst) räumlich gesonderte Körper 3 physikalisch-chemisch wie auch funktionell differente spezifische Virusanteile:

1. das allein infektiöse Elementarteilchen, Träger aller charakteristischen Viruseigenschaften;
2. das lösliche Antigen. Dieses Protein weist bei einem Partikelgewicht von etwa $1,5 \cdot 10^6$ einen Durchmesser von annähernd 15 μ auf. Das sphärische Teilchen neigt zur Aggregation und enthält 6 - 14 % Ribonukleinsäure; eventuell führt es eine wirtsspezifische, immunochemisch aktive Komponente mit sich. Abgesehen von der namengebenden Qualität zeigt es keine virusspezifischen Eigenschaften;
3. die "inkompletten Virusformen". Diese ballonförmigen Gebilde sind antigen wirksam, haemagglutininaktiv und hinsichtlich ihrer Größe sehr uneinheitlich (50 - 550 μ). Man sieht in ihnen Zwischenstadien der Virusvermehrung; durch Abbau infektiöser Elementarpartikel lassen sie sich nicht darstellen.

Die 3 K.P. Unterarten konnten als hochgereinigte Präparate isoliert werden, dagegen gelang die Konzentrierung der noch unzureichend erhaltenen "filamentösen Partikel" nicht. Im virusbedingten Multiplikationsprozeß der Zelle, die nach einer Latenzzeit von 3 - 5 std. p.i. das vermehrte K.P. Virus hervorbringt, erscheint zunächst - 3 std. p.i. - das lösliche Antigen, ca. 60 min. später das vom infektiösen Prinzip unabhängige Haemagglutinin ("inkomplette Virusform") und zuletzt der Träger der Infektiosität; das voll aktive (also auch haemagglutininaktive) Elementarpartikel.

Dieses Elementarpartikel als die "eigentliche" Substanz des K.P. Virus zieht vor allen anderen K.P. spezifischen Strukturen das Interesse auf sich. Elektronenmikroskopische Studien und solche an der SVEDBERG'schen Ultrazentrifuge charakterisierten es als einen spärlichen Körper mit einem Durchmesser von 70 - 80 μ . Ribo-Nukleinsäure macht 3 - 4 % seiner Substanz aus; zu 25 - 30 % besteht es aus Lipoiden; der Rest setzt sich, von einem kleinen Polysaccharid-Anteil abgesehen, aus verschiedenen Eiweißarten zusammen.

Nach mehrstündiger Exposition eines K.P. Viruspräparates in Äther finden sich in der Wasserpase zwei Arten nichtinfektiöser Spaltprodukte: das "gebundene Antigen" und das Haemagglutinin. Beide Degradationsprodukte haben kugelförmige Gestalt; die einzelnen Teilchen des "gebundenen Antigens" rücken jedoch unter normalen Bedingungen zusammen und liegen dann im Verband als kettenförmiges Aggregat vor. - Die Haemagglutininpartikel sind mit einem Durchmesser von 30 $m\mu$ doppelt so groß wie die primären Körperchen des "gebundenen Antigens".

Die Einheitlichkeit der Haemagglutininvolumina schließt ebenso wie die Tatsache, daß am (kleineren) "gebundenen Antigen"-Partikel eine im Haemagglutinin nicht vorkommende Substanz (Nukleinsäure, 10 - 15 %) beteiligt ist, die Vermutung aus, das Haemagglutinin stelle ein unvollständig abgebautes und bei Fortführung der Ätherspaltung in das "gebundene Antigen" zerfallendes Erzeugnis der chemischen Behandlung dar. - Die Erythrozyten verklumpende Kraft ist dem Haemagglutinin vorbehalten, außerdem unterscheiden sich die beiden Virusbausteine in ihrem elektrophoretischen Wert (nur Haemagglutinin enthält - zu 10 % - ein Kohlehydrat). Ferner konnte im Haemagglutinin ein Antigen festgestellt werden, das im "gebundenen Antigen" nicht angelegt ist. - Gleichartig verhalten sich die beiden K.P. spezifischen Partikel hinsichtlich der sero-immunologischen bzw. infektionsprotektiven Wirksamkeit.

Die Position des Haemagglutinins am K.P. Elementarteilchen wird durch die spezielle Funktion bestimmt: nur von der Oberfläche des K.P. Viruspartikels aus vermag es mit den Erythrozyten Kontakt aufzunehmen; auch das antigene Vermögen des intakten Virusteilchens in der Blutbahn solcher Tiere, deren Gewebe das K.P.Virus nicht vermehren, wäre anderenfalls nicht verständlich. - Da das "gebundene Antigen" nur in "befreiten" Zustände, nicht als fest eingefügter Bestandteil des Elementarpartikels immunisierende Aktivität entfaltet, sucht man seinen Sitz im Inneren des Elementarpartikels.

Dem Haemagglutinin obliegt es zweifellos, dem integren Virusteilchen an der Wirtszelle bzw. an der Erythrozytenmembran einen genügend langen Aufenthalt und damit u.U. dem infektiösen Prinzip Gelegenheit zum Angriff auf das Zellinnere zu verschaffen. - Der auffallend hohe Gehalt des "gebundenen Antigens" an Ribo-Nukleinsäure muß als ein Anzeichen dafür aufgefaßt werden, daß ihm Aufgaben bei der Autoreproduktion zugewiesen sind. Es ist noch unklar, ob das dem "gebundenen Antigen" so ähnliche "gelöste Antigen" im Verlauf der Virusschöpfung als vorgefertigtes Element in das Elementarpartikel eingebaut wird.

Das in den nachstehend referierten Experimenten verwendete K.P.Virusmaterial wurde auf dem Wege der Vermehrung im bebrüteten Hühnerei gewonnen. Die Tatsache, daß sich der Erreger der klassischen Hühnerpest besonders leicht und billig züchten läßt, war u.a. Veranlassung, diese Virusart für die Arbeiten zu wählen. Im einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen:

Die **notwendige** Anzahl frischer befruchteter Hühnereier blieb bei einer Temperatur von $38,5^{\circ}\text{C}$ während 11 Tagen im nicht zu trockenen Brutschrank. Nach dieser Zeitspanne läßt die Durchleuchtung der Bruteier eine Entscheidung darüber zu, ob ein inzwischen entwickeltes Hühnerembryo als voll vital - und damit zur Virusschöpfung geeignet - angesehen werden kann oder wegen mangelhafter bzw. ausgebliebener Entwicklung auszuscheiden ist. Als Kriterium gilt der "springende Punkt": die deutliche Pulsation des "fötalen Herzens".

Zur am 11. Tag der Bebrütung vorgenommenen Infektion der lebenden Bruteier wurde mit der Kanüle einer (sterilen) Tuberkulinspritze durch ein kleines Fenster am **stumpfen** Eipol eingegangen, die Eihaut am Grund der dort befindlichen Luftblase vorsichtig, d.h. ohne die Gefäße zu verletzen, gesprengt und gleichzeitig das infektiöse Impfmateriel (0,002 ml einer K.P.

virushaltigen Einflüssigkeit; Haemagglutinationstiter bei Prüfung an Hühnererythrozyten (s.u.) 1 : 128, der pro injectione 3 000 E. Penicillin zum Schutz gegen die Verbreitung eventuell eingeschleppter Bakterienkeime zugesetzt worden war) unmittelbar unter der Chorio-Allantoismembran deponiert. Die Öffnung von etwa 1 cm Durchmesser, die mit Hilfe einer chirurgischen Schere angebracht worden war - die spitze Branche hatte sich durch die (keimfreie) Eischale stoßen und ein rundes Stück einfach ausschneiden lassen -, wurde sofort nach der Impfung mit Cellophanklebestreifen verschlossen und dabei, um die Austrocknung der Embryonen zu verhüten, eine womöglich luftundurchlässige Abdichtung versucht. - Im Brutschrank, der die geimpften Bruteier unverzüglich wieder aufnahm, hielt sich die Luftfeuchtigkeit durch Aufstellen einer offenen Wasserschale nahe dem Sättigungspunkt. 48 std. p.i. wurden die (mittlerweile erkrankten oder gar abgestorbenen) Embryonen in den Kühlschrank (4 ° C) gebracht und damit tödlichen Bedingungen unterworfen.

Zur Virusernte dienten sterile Instrumente, auch waren die Hände dessen, der sie führte, sowie das Brutei mit Jodalkohol abgerieben und an der Luft getrocknet worden. - Zunächst wurde das Fenster erweitert, ohne den Embryo oder seine Hüllen anzutasten, dann die Chorio-Allantoismembran da eingerissen, wo sie als kreisrunde Scheibe freiliegt und die Eiflüssigkeit, sofern sie vollkommen klar war, aus den Embryonalhöhlen in ein bereitgestelltes, sauberes Gefäß gekippt. Dabei wurde darauf geachtet, den Dottersack zu schonen. Erfahrungsgemäß ist es am sichersten, mit der Manipulation am "dunklen Punkt" (Auge des Hühnchens) anzusetzen.

Das so gewonnene Viruspräparat wurde entweder bei 4 ° C aufbewahrt oder eingefroren. Bei den verschiedenen Gelegenheiten wurden durchweg Teile desselben K.P. virusinfektiösen Stammmaterials verimpft (SCHÄFER; 250. Hühnereipassage). Unter Einhaltung der angegebenen Methodik ergaben sich Haemagglutinationstiter (gegen Hühnererythrozyten; s.u.) zwischen 1 : 512 und 1 : 8 19%. - Zur Ausführung der Kontrollversuche war virusfreie Chorio-Allantoisflüssigkeit erforderlich. Sie wurde, in Verfolgung der oben vorgezeichneten Richtlinien, aus 13 Tage lang bebrüteten Hühnereiern erhalten.

Das einfachste Verfahren, weitgehend gereinigte, d.h. von wirtsspezifischem Protein befreite Virussuspensionen zu gewinnen, läßt sich bei Anwendung des Prinzips der spontanen Virusadsorption und -elution durchführen. x ml einer K.P. virushaltigen Eiflüssigkeit (4 ° C) wurden mit gekühlten, 3 Mal gewaschenen und "trockenen" (aus einem kompakten Zellsediment stammenden) Hühnererythrozyten im Verhältnis 20 : 1 vermischt; diese Virus-Erythrozyten-

aufschwemmung blieb während 40 min. im Kühlschrank. (Bei niedrigen Temperaturen wird das Ausmaß der ("biologischen") Elution stark, der ("physikalischen") Adsorption dagegen kaum eingeschränkt.) Nach dieser Zeitspanne war in der Chorio-Allantoisflüssigkeit freies K.P. Virus nur mehr in einer um 4 halbschlächlige Verdünnungsstufen niedrigeren Partikeldichte (Haemagglutinationskraft) nachweisbar. - 1 std. nach Beginn der Virus-Zellreaktion wurden die Hühnererythrozyten bei 4 ° C in der Zentrifuge abgeschleudert. Der Überstand wies den gleichen Haemagglutinationstiter auf wie die 20 min. früher entnommene Probe (Oberflächen der roten Blutkörperchen mit Virusteilchen maximal besetzt). - Die Erythrozyten wurden nun 4 Mal in kühler (4 ° C) physiologischer Kochsalzlösung (jeweils 2 Mal x ml) gewaschen und die Überstände im Haemagglutinationstest geprüft: die Haltbarkeit der Haemagglutinin-Rezeptorkoppelung zeigte sich im negativen Ausfall der HIRST'schen Proben. Anschließend wurde das vorliegende Erythrozytensediment in $\frac{x}{2}$ ml physiologischer Kochsalzlösung aufgewirbelt und während 5 std. bei 37 ° C bebrütet. In der Zentrifuge erfolgte dann die Abtrennung der Zellen von ihrem Medium (Eluat), dessen Haemagglutinationstiter stets demjenigen des Ausgangsmaterials entsprach. - Das gereinigte K.P. Viruspräparat wurde bei 4 ° C aufbewahrt.

Die unten mitgeteilten Versuche beschäftigten sich zumeist mit K.P. Virus, das irreversibel an die Oberfläche des roten Blutkörperchens fixiert wurde. Um jedoch das rezeptordestruierende stoffliche Substrat am Viruspartikel zu treffen, das die spontane Abdissoziation der Teilchen von der virusokkupierten Erythrozytenmembran ermöglicht, ohne mit solchen Maßnahmen das haemagglutinierende Prinzip oder ein anderes wesentlich anzugreifen, wurde das K.P. Präparat mit Natriumperjodatlösung (nach HIRST) behandelt (24).

Zu diesem Zweck wurden gleiche Volumina einer K.P. Virussuspension (er-regerhaltige Chorio-Allantoisflüssigkeit oder gereinigtes Virus) und einer $\frac{in}{100}$ Natriumperjodatlösung bei Zimmertemperatur vermischt und nach 60 min. 2 Teile einer physiologischen Glukoselösung (5,4 %) zugesetzt. Während der Inaktivierung fällt i. a. der Haemagglutinationstiter auf $\frac{1}{8}$ bis $\frac{1}{32}$ des ursprünglichen Wertes (d.h. mehr als der Verdünnung durch die Agenzien entspricht), weshalb die "perjodierte" Virusaufschwemmung vor Verwendung routinemäßig auf ihre erythrozytenverklumpende Kraft hin erneut getestet wurde.

Während über die perjodatbedingten biochemischen Reaktionen am Virus-

substrat Endgültiges nicht bekannt ist, weiß man, daß die überschüssig zugesetzte Glukose das Perjodat, ein spezifisches Oxydant für cis-cis-Diole, unter Bildung von Formaldehyd und Ameisensäure reduziert und damit die inaktivierenden Prozesse am Virussubstrat unterbricht (35).

Für gewisse Experimente ist es Voraussetzung, daß der **Untersucher** über besonders **hochwertige** Viruspräparate verfügt. Im virologischen Schrifttum finden sich deshalb vielfach Hinweise auf die Möglichkeit, durch Anwendung der Dialyse die Haemagglutinationskraft einer virushaltigen Gewebeaufschwemmung oder Chorio-Allantoisflüssigkeit zu steigern. Der potenzierende Effekt rührt von der Migration diverser Haemagglutinationsinhibitoren durch die semipermeable Wand her.

Auf dem Wege der **Dialyse** frischer K.P. **virushaltiger** Chorio-Allantoisflüssigkeit während 92 Std. gegen große Volumina eines $\frac{m}{15}$ Phosphatpuffers, pH 7,2 ließ sich eine Erhöhung des Haemagglutinationstiters auf das 8-fache erreichen. - Die Bestimmung der Endwerte wurde mit Hilfe des HIRST'schen Tests vorgenommen. Der von 1 : 2 048 auf 1 : 16 384 angehobene Titer erniedrigte sich durch 3-wöchige Lagerung der Virussuspension bei - 20 ° C nicht.

d) Das Antiserum

Zur Beschaffung des K.P. virusspezifischen Antiserums wurden ausgewachsene, gesunde Kaninchen immunisiert. Als Impfmateriel diente ein im Adsorptions-Elutionsverfahren gereinigtes, dialysiertes K.P. virushaltiges Präparat, dessen Haemagglutinationstiter gegen Hühnererythrozyten 1 : 2 048 betrug. (Um hühnererythrozytenspezifischen Immunreaktionen bei der späteren Verarbeitung des Serums in Hühnererythrozytensuspensionen vorzubeugen, hatten wir zur Antigengewinnung humane Blutkörperchen verwendet.) - Unter sterilen Bedingungen wurde jedem Tier mittels einer Tuberkulinspritze 8 Mal, in 2-tägigen Abständen, jeweils 1 ml der Antigenflüssigkeit in die Ohrvenen injiziert.

5 bzw. 8 Wochen nach Beginn der Impfung erfolgte die Entblutung der Kaninchen aus den Ohrgefäßen unter Benützung der von RUHENSTROTH-BAUER angegebenen Saugglocke. Das Serum ließ sich auf die übliche Weise abtrennen. 24-stündiges Fasten des Tieres vor der Blutentnahme verhinderte hämolytische Erscheinungen während der Retraktionsphase. Zum einen Teil wurde das Serum nach Prüfung seines Hemmtiters (s.u.; meist 1 : 2 048) bei 4 ° C aufbewahrt, zum anderen Teil in gefrorenem Zustande konserviert.

Um das Kontrollserum zu erhalten, wurde bei der Herstellung des Antigenpräparates von virusfreier Chorio-Allantoisflüssigkeit ausgegangen, im übrigen aber verfahren wie bei der Gewinnung des antikörperhaltigen Serums.

Da Immunsereen nicht nur spezifische Antikörper, sondern daneben noch die erwähnten unspezifischen Antihämagglutinine ("Normalglobuline", rezeptorartige Hemmstoffe) führen, ist das hemmende Vermögen des Serums, wie es sich in der Höhe des Titors ausdrückt, als die Summe der spezifischen und der unspezifischen antihämagglutinierenden Aktivität zu verstehen. Der Gebrauch "avider" Virusarten reduziert allerdings die unspezifischen Effekte zu vernachlässigbaren Größen, denn der spezifische Antikörper behält vermöge seiner größeren virusgerichteten Bindungskräfte in der Konkurrenz um den Zellrezeptor gegenüber den unspezifischen Hemmstoffen die Oberhand. Die Spezifität der virusbedingten Antigen-Antikörperreaktion kann ferner durch die Inaktivierung der Seren bei 62,5 ° C während 30 min. gefördert werden. Dieser Eingriff wurde vor Verwendung unserer Seren auch stets vorgenommen. Er beseitigt die störenden natürlichen Hämolysine ebenso wie die thermolabilen Hemmstoffe. Die stufenweise Verdünnung des Serums, z.B. bei der Vorbereitung der Hemmversuche (s.u.), geht vor allem auf Kosten der unspezifischen Wirkungen; vollends zu eliminieren sind die thermostabilen Antihämagglutinine, die sich spontan an den Zelloberflächen niederschlagen, durch Adsorption an Erythrozyten.

2. Methoden zur Prüfung des Materials

a) Der Virusnachweis im Hämagglutinationstest

Unter allen bislang erprobten Verfahren, Virus nachzuweisen, zeichnet sich der direkte Hämagglutinationstest nach HIRST, McCLELLAND und HARE durch die Einfachheit der Technik sowie Material- und Zeitersparnis aus. An Empfindlichkeit wird er zwar vom Infektions-Tierversuch übertroffen, doch bietet sich mit ihm für Experimente, deren Forschungsobjekt die Virus-Erythrozytenreaktion ist, der einzig adäquate Maßstab deshalb an, weil als Maßeinheit zumeist nur die effektive agglutinierende Aktivität interessiert. (Es wurde schon oben ausgeführt, daß sich im allgemeinen von der Infektiosität auf die Hämagglutinationskraft, und umgekehrt, nicht schließen läßt.)

Das Prinzip, halbschächtige Virusverdünnungen in absteigender Reihenfolge jeweils mit gleichbleibenden Teilen einer Zellsuspension zu vermischen und nach festgesetzter Zeitspanne den Zustand der roten Blutkörperchen zu beur-

teilen, liegt allen Standard-Methoden zugrunde, wie sie von HIRST (3), BURNET (88), MILLER und STANLEY (88), SALK (82) und WHITMAN (88) ausgearbeitet worden sind. Die Verfahren der genannten Autoren eignen sich zur Ermittlung reproduzierbarer und (begrenzt) vergleichbarer Titerwerte.

Die Fehlerquellen, die sich für den Haemagglutinationstest auftun, können bei Anwendung einer zweckentsprechenden und sorgfältigen Technik ohne große Mühe zugeschüttet werden. Zu den wichtigsten Voraussetzungen gehört der Schutz der zu prüfenden Virussuspension vor bakterieller Verunreinigung. Die Gefahr, bezüglich der Spezifität des Tests einer Täuschung zu unterliegen, wird bei der Arbeit mit gewissen ausgesuchten Virusarten von vorneherein vermieden. (Der von van HERICK und EATEN isolierte haemagglutinierende "pneumonieartige Erreger" beispielsweise wird nur von solchen Allantoiszellen produziert, die zuvor einer Infektion mit dem Virus der atypischen Pneumonie ausgesetzt worden sind (83)). Zum anderen fehlen in der virushaltigen Eiflüssigkeit, einem bevorzugten Viruspräparat, Haemagglutinine, die in Gewebesuspensionen mit Regelmäßigkeit auftreten. (Erwähnt sei die haemagglutinierende Wirkung von normalem Mäusegehirn gegen Hühner- und **Mäuseerythrozyten**). Und endlich gestattet die Selektion bestimmter Erythrozytenarten, "unspezifischen" Erscheinungen aus dem Wege zu gehen (z.B. werden nur die roten Blutzellen des Kaninchens von den Agglutininen verklumpt, die in allen Geweben des Hühnerembryos vorkommen (84)). Als verbindlich kann der Ausfall eines Haemagglutinationstests jedenfalls dann angesehen werden, wenn ihn sinnvolle Kontrollversuche schlüssig ergänzen (etwa die Variation der Reaktionskomponenten derart, daß zum einen die wahrscheinlich virushaltige, zum anderen eine sicher virusfreie Eiflüssigkeit ausgetestet wird).

Die im Rahmen der unten mitgeteilten Experimente praktizierte Technik folgte den Vorschriften SALKS (82) und bewährte sich als Routinemethode. - Die Testgläschen, die dem einen Zweck der Virusauswertung vorbehalten und peinlich sauber sein müssen, wurden in einem Gestell zu 12 oder 24 Stück aufgereiht. Die Herstellung der halbschlächtig und absteigend verdünnten Virusproben erfolgte mit physiologischer Kochsalzlösung o.a. als Medium in den Glasröhrchen, und zwar durch fortgesetztes Überpipettieren der Hälfte der im betreffenden Reagenzgläschen zuvor kräftig durchmischten Flüssigkeit. (Zu Beginn waren im 1. Testgläschen die fragliche Virussuspension und physiologische Kochsalzlösung o.a. im Verhältnis 1:1 (0,5 ml zu 0,5 ml) vereinigt worden.) - Den solcherart bereiteten Vi-

rusverdünnung mit einem Volumen von jeweils 0,5 ml wurden alsdann gleiche Mengen einer 0,25 %igen Hühnererythrozytensuspension zugesetzt und die Reaktionskomponenten durch Schütteln in einen engen und gleichmäßigen Kontakt gebracht. Ohne zu zentrifugieren oder sonstige Maßnahmen zu treffen, wurde die Virus-Zellsuspension bei Zimmertemperatur stehen gelassen und das Sediment nach 90 und 120 min. betrachtet.

Von der Qualität der Erythrozytensuspension hängt zu einem guten Teil das Gelingen des Haemagglutinationstests ab. Stehen Versuche an, die direkte Titervergleiche voraussetzen oder anstreben, so müssen die Testerythrozyten vom selben Tier stammen, denn die Agglutinabilität individueller Blutproben differiert immerhin u.U. so stark, daß die Unterschiede von der HIRST'schen Probe erfaßt werden. - Da die Höhe des resultierenden Haemagglutinationstiters in umgekehrt proportionalem Verhältnis zur Erythrozytenkonzentration steht, muß die Einstellung der Blutkörperchenaufschwemmung auf eine Zelldichte von 0,25 % sehr sorgfältig vorgenommen werden.

Der Haemagglutinationstiter wird bestimmt in Bewertung des Aspektes, den das Erythrozytensediment bei der Inspektion von unten bietet. Dabei gilt als Endpunkt jene Verdünnung des ursprünglichen Viruspräparates, die als höchste bzw. letzte in der halbschlächtig absteigenden Reihe eine (komplette oder partielle) Agglutination der roten Zellen bewirkt hat. - Die typischen "Bilder" eines Haemagglutinationstests werden folgendermaßen bezeichnet:

$\begin{smallmatrix} + \\ + \end{smallmatrix}$ = flach ausgebreitetes, "granuliertes" Sediment; die Membran löst sich in groben Fetzen von der Glaswand und schiebt sich teilweise in der Kuppe des Röhrchens zusammen: extrem positiver Ausfall der Reaktion.

$\begin{smallmatrix} + \\ + \end{smallmatrix}$ = der feinkörnige Wandbeschlag ist durchaus gleichmäßig und bleibt am Glas haften: eindeutig positive Reaktion.

+ = ein Hof von Zellaggregaten umgibt einen zentralen Bezirk, der von nicht agglutinierten Zellen eingenommen wird: partielle Agglutination; diese Grenzreaktion repräsentiert den Titer.

- = linsenförmiges, scharf begrenztes Sediment: Reaktion negativ. (Weisen die Teströhrchen am Boden eine ungleichmäßige Rundung auf, so kommt es zu Verzerrungen der typischen "Bilder".)

Das virusbedingte Agglutinat ist bei Zimmertemperatur sehr locker beschaffen und (durch Aufschütteln) leicht wieder im Suspensionsmedium zu vertei-

len. Die sofort einsetzende erneute Sedimentation beansprucht weniger Zeit als die erste Zellabscheidung. Diese charakteristische Reversibilität der Agglutination nimmt mit steigender Temperatur zu; die Bebrütung der Virus-Erythrozytengemische ist deshalb unzweckmäßig und läßt bei 37 °C eventuell verwischte Agglutinationsbilder entstehen. - Der HIRST-Test liefert wegen der vergleichsweise hohen "Avidität" des K.P.Virus zum Hühnererythrozyten bei der Arbeit mit diesen Reaktionspartnern sehr eindeutige Ergebnisse; darin liegt ein Vorzug der von uns gewählten Kombination.

Die Frage nach der Art und den Kräften der Zellkoppelung als Folge der Viruseinwirkung wird heute, aufgrund eingehender - zum Teil elektronenoptischer - Studien und quantitativer Überlegungen im Sinne der Theorie HEINMETS beantwortet: die an die Oberfläche der Blutkörperchen adsorbierenden Viruspartikel selbst stellen (als Brücken) die Verbindung zwischen den Erythrozyten her. Die Vorstellung, daß das Virus die Zellen sensibilisiert und diese dann (sekundär) agglutinieren, ist vielfach widerlegt, u.a. durch die Beobachtung, daß in jedem Agglutinat virusbesetzte, aber freie, d.h. nicht agglutinierte Erythrozyten aufgefunden werden (85).

b) Der Antikörpernachweis im Hemmungstest

Der Gedanke, den Eintritt der Virus-Zellreaktion, d.h. die Ausbildung eines Agglutinats, von einer zusätzlichen, spezifisch hemmenden Komponente abhängig zu machen und damit Existenz und Wertigkeit eines solchen inhibtiven Prinzips zu sichern, wurde von HIRST (1, 3) und McCLELLAND und HARE (2) schon in ihren grundlegenden Arbeiten zum Haemagglutinationstest realisiert. Sie stellten fest, daß die Vorbehandlung des standardisierten Testvirus mit korrespondierenden Antiseren die virusbedingte Haemagglutination typspezifisch unterbindet und führten die erste Titration in vitro durch. - Gilt dieses Verfahren seither auch zurecht als ein leistungsfähiges Hilfsmittel der Virologie, so ergeben sich doch gegenüber dem direkten Haemagglutinationstest mit dem Dazutreten einer dritten Reaktionskomponente eine Reihe von Schwierigkeiten, denn alle drei Reaktionsteilnehmer - Erythrozyten, Virus, Serum - stellen Variable dar und beeinflussen das Ergebnis der Serumauswertung. (Einzelheiten wurden bei der Besprechung des Materials diskutiert).

Der Hemmungstest unterscheidet sich vom direkten Haemagglutinationstest, was die (gleichermaßen unkomplizierte) Prozedur betrifft, lediglich in der vorweggenommenen Vereinigung von Viruspräparat und fraglichem Serum,

bei positivem Ausfall der Reaktion in der Absättigung des Haemagglutinins durch den spezifischen Antikörper. - Um die neutralisierende Potenz des Antiserums zu messen, wird dieses aus den oben angegebenen Gründen zunächst hitzeinaktiviert, dann mit physiologischer Kochsalzlösung in halbschlüchtig absteigender Reihe verdünnt. Das Verfahren entspricht - auch quantitativ - der Praxis, die bei der Herstellung der Virusdilutionen für den Haemagglutinationstest geübt wird. - Eine Virussuspension mit einer Testdosis von 4 agglutinierenden Einheiten (- Einstellung nach Maßgabe eines vorgeschalteten HIRST-Tests: das "Titerröhrchen" enthält 1 agglutinierende Einheit -) wird bereitgehalten und jeweils 0,5 ml davon mit den Antiserumproben zusammengeschüttet und der Inhalt des Reagenzgläschens sodann kräftig durchmischt. - Da Virus und zugehöriger Antikörper sich sehr rasch verbinden, entfällt eine Bebrütung. Nach Zugabe von 0,5 ml einer 0,25 %igen Erythrozytenaufschwemmung wartet man die Sedimentation der Zellen ab und bestimmt nach 90 und 120 min. den Hemmtiter. Die Verdünnung des letzten Röhrchens, in dessen Kuppe die Blutkörperchen knopfförmig und ohne "Agglutinationshof" lagern, entspricht einer hemmenden Einheit und repräsentiert den Hemmtiter des geprüften Serums. (Eine HIRST-Test-Reihe zeigt, diesmal von rechts nach links gelesen, die typischen "Bilder" eines Haemagglutinationshemmungstests mit dem Titer bei der letzten - Reaktion).

E. VORVERSUCHE

1. Der isoelektrische Punkt nativer Hühnererythrozyten

Da bei unseren kataphoretischen Experimenten zumeist mit Hühnererythrozyten gearbeitet wurde, untersuchten wir zunächst die Lage des isoelektrischen Punktes (I.P.) der intakten, vom Plasma isolierten roten Zellen in der H-Ionenstärken-Skala. - Der I.P. läßt sich finden, indem man die elektrophoretische Beweglichkeit der Erythrozyten bei wechselndem Säuregrad des Suspensionsmediums in der Kataphoresekammer prüft. Verhalten sich in einer bestimmten Pufferprobe die suspendierten Zellen gegen das angelegte elektrische Feld indifferent, d.h. bleiben sie nach Einschalten des elektrischen Stromes unbewegt, so bezeichnet die H-Ionenstärke des Mediums den pH-Wert des Zell-I.P. Er entspricht im "pH/V-Schaubild" dem Ort des Schnittpunkts von Beweglichkeitskurve der Erythrozyten und Nullachse der Mobilität.

(Exp. I; Einzelheiten s. Protokoll Seite 73.)

Fig. 4 stellt das Ergebnis des Versuches graphisch dar; der elektrische Ladungsausgleich tritt demnach an der Hühnererythrozytenmembran bei etwa pH 4,9 ein.

PIPER und RUHENSTROTH-BAUER (86) haben gezeigt, daß sich die in der Zellsuspensionsflüssigkeit vorhandenen Eiweißkörper in quantitativer Abhängigkeit von der Ionenstärke des Mediums an der Erythrozytenmembran niederschlagen und damit die kataphoretisch faßbaren Oberflächeneigenschaften der roten Blutzellen verändern; auch gaben sie zum Vergleich die Beweglichkeitskurven eiweißfreier und eiweißbedeckter humaner Erythrozyten an. Der Verlauf der von uns für Hühnererythrozyten ermittelten elektrophoretischen Mobilitätskurve, insbesondere der hohe pH-Wert des I.P. sowie die Umstände der routinemäßigen Vorbereitung der Zellen zur Messung (s. Protokoll) sprechen nun für die Adsorption von Proteinmolekülen an die untersuchten Hühnererythrozyten. Tatsächlich reichen nach PIPER und RUHENSTROTH-BAUER kleinste Mengen gelösten Haemoglobins hin, um den I.P. in alkalischer Richtung zu verschieben; die Verletzung bzw. Haemolyse einzelner Zellen aber läßt sich praktisch ohne geeignete Vorkehrungen nicht vermeiden.

Zur Kontrolle unseres Ergebnisses prüften wir unter unseren Standardbedingungen humane Erythrozyten der Blutgruppe A.

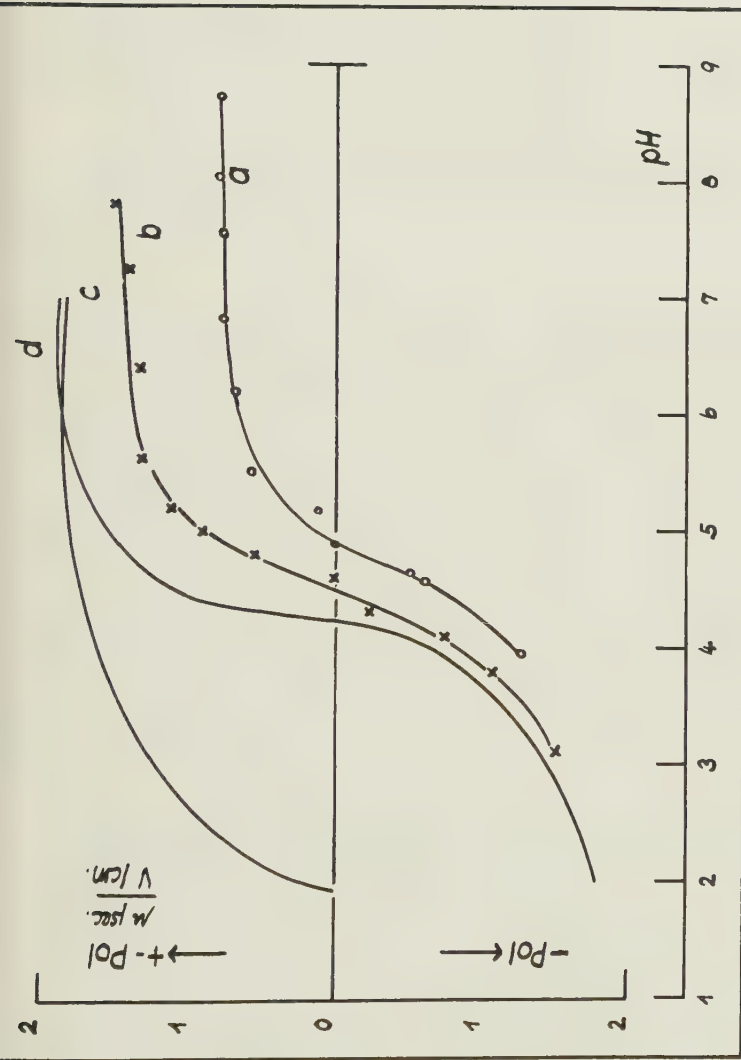


Fig. 4: Beweglichkeitskurven nativer, gewaschener Erythrozyten a) vom Huhn; b) vom Menschen; c) vom Menschen, in 5 %iger Albuminstandardlösung (PIPER und RUHENSTROTH-BAUER); d) wie c), jedoch in proteinfreiem Medium; die Ionenstärke des Zellmilieus betrug 0,0375 (a) und b) (bzw. 0,03(c) und d)).

(Exp. II; Einzelheiten s. Protokoll Seite 74 .)

Das in Fig. 4 eingezeichnete Schaubild der elektrophoretischen Mobilität für humane Erythrozyten der Blutgruppe A steht in Übereinstimmung mit den in der Literatur vorgewiesenen Kurven und erlaubt, was die Entscheidung der Frage nach der Proteinbedeckung der Zellen anlangt, einen Analogieschluß auf Hühnererythrozyten in positivem Sinne. (Die von PIPER und RUHENSTROTH-BAUER angegebenen, für die roten Blutkörperchen des Menschen charakteristischen Beweglichkeitskurven wurden zum Vergleich mit unseren Schaubildern in Fig. 4 übernommen.) - Der Zell-I.P. liegt bei pH 4,6.

Die von PIPER und RUHENSTROTH-BAUER (86) herausgestellte Beziehung zwischen den Milieufaktoren und dem Ausmaß der Eiweißadsorption an die Zellmembran drückt sich offenbar in einer strikten quantitativen Relation aus; jedenfalls ließ sich die unter Standardbedingungen gemessene Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld befindlicher Hühnererythrozyten bei geringer Streuung der Werte sicher reproduzieren (s. Untersuchungen zur Bestimmung der methodischen Fehlerbreite). - Wird die Beurteilung von Virus-Zellreaktionen u. a. Vorgänge an absolut "sauberen" Erythrozytenoberflächen versucht, so veranlassen die erheblichen Schwierigkeiten bei der Befreiung und beim Schutz der Zellmembranen größere Fehler, als sie bei unserer Routinemethode tatsächlich in Erscheinung treten. Der teilweise proteinbedeckte Erythrozyt erwies sich in unseren Versuchen als ein zuverlässiger, gut definierter Reaktionsteilnehmer: die uns interessierenden biologischen Prozesse spielten sich an elektrophoretisch einheitlichen Zelloberflächen ab.

2. Der Unterschied in der Agglutinationskraft des K.P. Virus gegenüber Hühner- und humanen Erythrozyten

In parallel geführten Haemagglutinationsversuchen sollte das verschiedenartige Zellmaterial auf seine Agglutinationsfähigkeit durch Virus ("Avidität") vergleichend geprüft werden.

(Exp. III; Einzelheiten s. Protokoll Seite 74 .)

Den K.P. Virusproben identischer Provenienz kam bei Reaktion mit menschlichen Erythrozyten der Blutgruppe B ein Titer von 1 : 16 zu, während wir bei Auswertung an Hühnerzellen einen solchen von 1 : 64 fanden. Der Vergleich konzentrierterer Virussuspensionen aus einer anderen Eipassage zeitigte Titer von 1 : 262 144 bzw. 1 : 1 048 576. Diese Befunde bestätigten die bekannte Reaktionsfreudigkeit des K.P. Virus mit dem Hühnererythrozyten.

Es sei angemerkt, daß die $\ddagger$ - Bilder humaner Testerythrozyten sich als kompakte, grobe Zellhaufen in $\ddagger$ der Kuppe des Reagenzgläschens darstellen und dem Aspekt ähneln, wie ihn sonst Haemagglutinationsproben mit negativem Ausfall aufweisen; die $\ddagger$ - Bilder dagegen bieten sich in charakteristischer Weise dar.

3. Die Hemmwirkung von Virus-Antiseren auf die durch aktives und inaktives K.P. Virus bedingte Haemagglutination

In parallel geführten Haemagglutinations-Hemmungsversuchen wurde ein virusspezifisches Antiserum zum einen gegen vollaktives, zum anderen gegen perjodatinaktiviertes Virus angewendet. Nach Maßgabe vorgängiger HIRST-Proben waren die beiden Virus-Stammsuspensionen, die ursprünglich einem einheitlichen Chorio-Allantoispräparat angehört, dann aber - wegen der "Perjodierung" der einen - sich nicht nur bezüglich ihrer infektiösen und rezeptordestruktiven Qualität, sondern auch im Haemagglutinationstiter unterschieden hatten, vor ihrer Verwendung als Testmaterial in physiologischer Kochsalzlösung auf 4 agglutinierende Einheiten verdünnt worden.

(Exp. IV; Einzelheiten S. Protokoll Seite 74 .)

Das überraschende Ergebnis dieser Versuche ist die vollkommene Übereinstimmung der Hemmtiter. Es ist demnach gleichgültig, ob zur Bemessung des Antikörpergehalts aktives oder perjodatvorbehandeltes Virus dient.

Wie erwähnt, berauben zureichend intensive Inaktivierungsmaßnahmen die Viruspartikel der Fähigkeit zur Infektion und Elution und setzen regelmäßig auch das haemagglutinierende Vermögen herab. Unser Befund kann nun - vorerst - nur so verstanden werden, daß das inaktivierende Agens Perjodat, jedenfalls bei der von uns gewählten Konzentration und Einwirkungsdauer, nicht nur die haemagglutinierende Kraft, sondern auch die antikörperbindende Funktion der betroffenen Virusteilchen beeinträchtigt. In ihrer Resistenz würden sich demnach die Virusprinzipien der Haemagglutination und der Antikörperbindung, zumindest gegenüber Perjodat, nicht oder doch in so geringem Grade unterscheiden, daß eine eventuelle Differenz im Haemagglutinations- bzw. im Hemmtest nicht sichtbar gemacht werden kann. - (Wenn es - nach unseren Feststellungen - auch von untergeordneter Bedeutung für die Beurteilung der angegebenen Wertigkeit eines Antiserums bleibt, ob die quantitative Antikörperbestimmung an aktivem oder inaktivem K.P. Virus vorgenommen worden ist, so soll doch bei den Hemmungsversuchen die Art des Testvirus vermerkt werden.)

4. Der Einfluß von Ionenstärke und Säuregrad des Reaktionsmilieus auf den Haemagglutinationstiter

Diese Experimente mit dem HIRST-Test sollten dazu beitragen, die optimalen Reaktionsbedingungen zu finden, darüber hinaus aber auch das qualitative und quantitative Verständnis der virusbedingten Haemagglutination fördern. - Um die Beziehung zwischen Haemagglutinationstiter und Ionenstärke des Reaktionsmilieus zu untersuchen, suspendierten wir vor Ausführung des Haemagglutinationstests die Reaktionsteilnehmer, d.h. K.P. Virus und Hühnererythrozyten, in Lösungen bestimmter Elektrolytkonzentration. (Der Säuregrad der Medien lag zunächst durchweg zwischen pH 6 und pH 6,5.) Zu diesem Zweck wurde die gewöhnlich als Suspensionsflüssigkeit verwendete 0,85 %ige Kochsalzlösung durch Zusatz von reiner isotonischer Glucoselösung auf die gewünschte Ionenstärke eingestellt. Die Virustitration nahmen wir in 6 verschiedenen solcherart gewonnenen Medien vor.

(Exp. V; Einzelheiten s. Protokoll Seite 75.)

Um den Beginn eventueller, durch die unphysiologischen Lösungen bedingter haemolytischer Erscheinungen hinauszuschieben, wurden die Virus-Verdünnungsreihen vor Herstellung der Erythrozytenaufschwemmung angelegt; dabei erfolgte die Dilution der ursprünglichen virushaltigen Chorio-Allantoisflüssigkeiten in den verschiedenen konzentrierten Elektrolytenlösungen, und zwar wurden gleichzeitig und gleichartig eine nach der Standardmethode perjodatinaktivierte und eine voll aktive Virussuspension den jeweils 6 Haemagglutinationstests unterworfen. - Die Hühnerzellen wurden aus einer Stammaufschwemmung ebenfalls in die Medien gebracht und unmittelbar nach ihrer Suspendierung den Virusproben der vorbereiteten, korrespondierenden Virus-Verdünnungsreihe zugefügt. - Der Fehler, der durch die Verschleppung eines Bruchteils der primären Chorio-Allantoisflüssigkeit (von etwa physiologischem pH-Wert) bedingt war, fiel, insbesondere bei den verwendeten hochwirksamen Viruspräparaten und wegen der Pufferwirkung der Suspensionsflüssigkeit nicht ins Gewicht. - In niederionigem Milieu unterscheidet sich der Aspekt des Erythrozytensediments bei negativem Ausfall der HIRST-Probe vom $\dagger$ -Bild durch die feinere "Granulierung" des Zellbelages. Dieses Merkmal muß neben dem (hier etwas unsicheren) Kriterium der linsenförmigen Anordnung der abgeschiedenen roten Blutkörperchen bei der Auswertung der Haemagglutinationstests berücksichtigt werden. Der Endwert läßt sich dann mit Sicherheit ablesen. Wegen der Haemolyse infolge Permeation der Glucosemoleküle nimmt der Inhalt der beiden extrem elektrolytarmen Reihen eine leicht rötliche Färbung an.

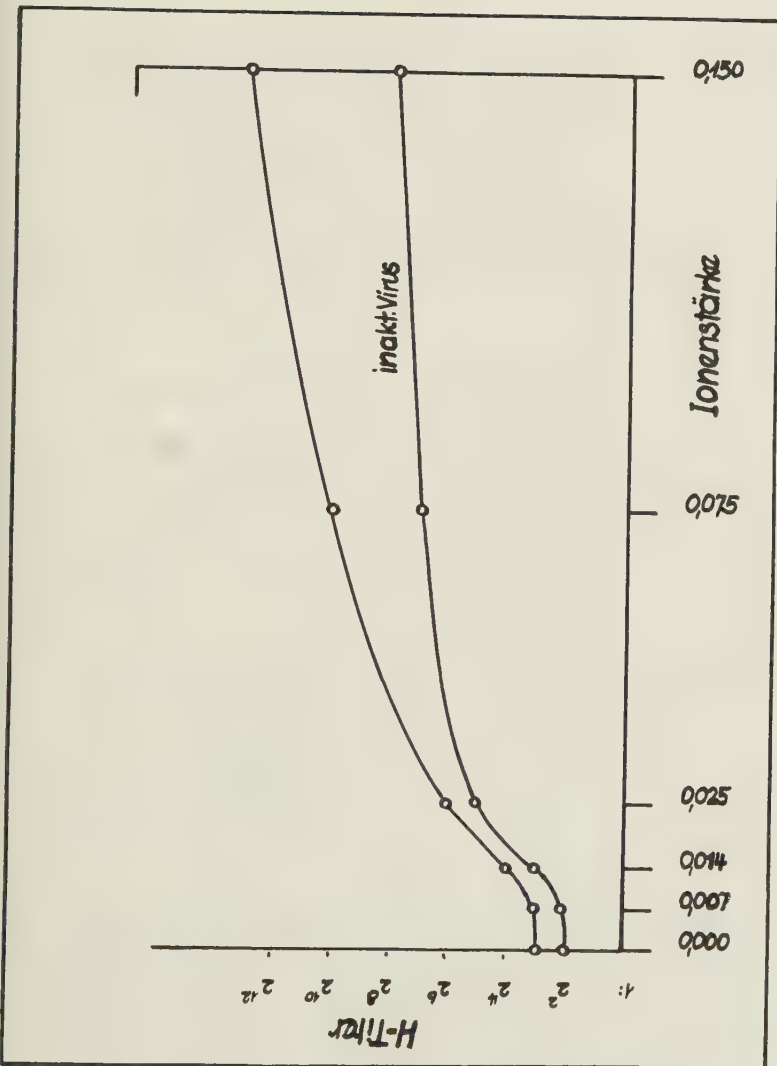


Fig. 5: Die Abhängigkeit des Haemagglutinationstiters von der Ionenstärke des Reaktionsmediums

Die Titerfeststellungen führten zu dem in Fig. 5 anschaulich gemachten Ergebnis (s. Protokoll).

Um die Abhängigkeit des Haemagglutinationstiters von der Ionenstärke sowie dem Säuregrad des Reaktionsmilieus aufzudecken, wählten wir die Versuchsanordnung so, daß sich beide Eigenschaften des Suspensionsmediums "frei" variieren ließen: auf jeder von 3 pH-Stufen wurde die Elektrolytkonzentration über eine Skala von 4 verschiedenen Graden in absteigender Verdünnungsfolge bemessen und in jeder der auf diese Weise qualifizierten Lösungen der Haemagglutinationstest ausgeführt. Dabei bestimmte sich in gleichlaufenden HIRST-Proben der Haemagglutinationstiter zum einen für voll aktives, zum anderen für perjodatinaktiviertes K.P.Virus.

(Exp. VI; Einzelheiten s. Protokoll Seite 75 .)

Das Ergebnis dieser Versuchsreihe ist in Fig. 6 graphisch dargestellt.

Die auf einer "pH-Stufe" stehenden Suspensionsflüssigkeiten differierten wegen der ungleichen Volumina der zugemischten Glucoselösung um ein wenig. Deshalb wurden an der Kurve konstanter Ionenstärke (Fig. 6) die Titerwerte, die der H-Ionenkonzentration pH 4, pH 6, pH 8 entsprechen, abgelesen und als Punkte der Kurve konstanter pH-Werte (Fig. 7) aufgezeichnet.

Der Haemagglutinationstiter erniedrigt sich demnach sowohl mit sinkender Elektrolytkonzentration als auch mit fallendem Säuregrad des Reaktionsmilieus. Diese Relationen werden offensichtlich von Exponentialkurven repräsentiert. - Abgesehen von Angaben über die Stabilität des Haemagglutinins verschiedener Virusarten bei Lagerung in Lösungen bestimmter H-Ionenkonzentration (36, 9) fanden wir in der Literatur keine Anhalte zur biologischen Analyse unserer Resultate. Aus den erwähnten Arbeiten geht immerhin hervor, daß eine einfache, strukturelle und irreversible Schädigung des Haemagglutinins für diese Verhältnisse kaum verantwortlich gemacht werden kann. Noch weit weniger möglich wäre eine solche Annahme als Erklärung für den Einfluß der Ionenstärke auf den Ausfall des Haemagglutinationstests. Bei eigenen Untersuchungen fanden wir nämlich bezüglich der Agglutinabilität keine irreversiblen Alterationen des virusspezifischen Erythrozytenrezeptors, als er während einigen Stunden auf einer unserer extremen "pH-Stufen" (s.o.) exponiert und anschließend in ein Milieu von neutraler Reaktion zurückgeführt worden war.

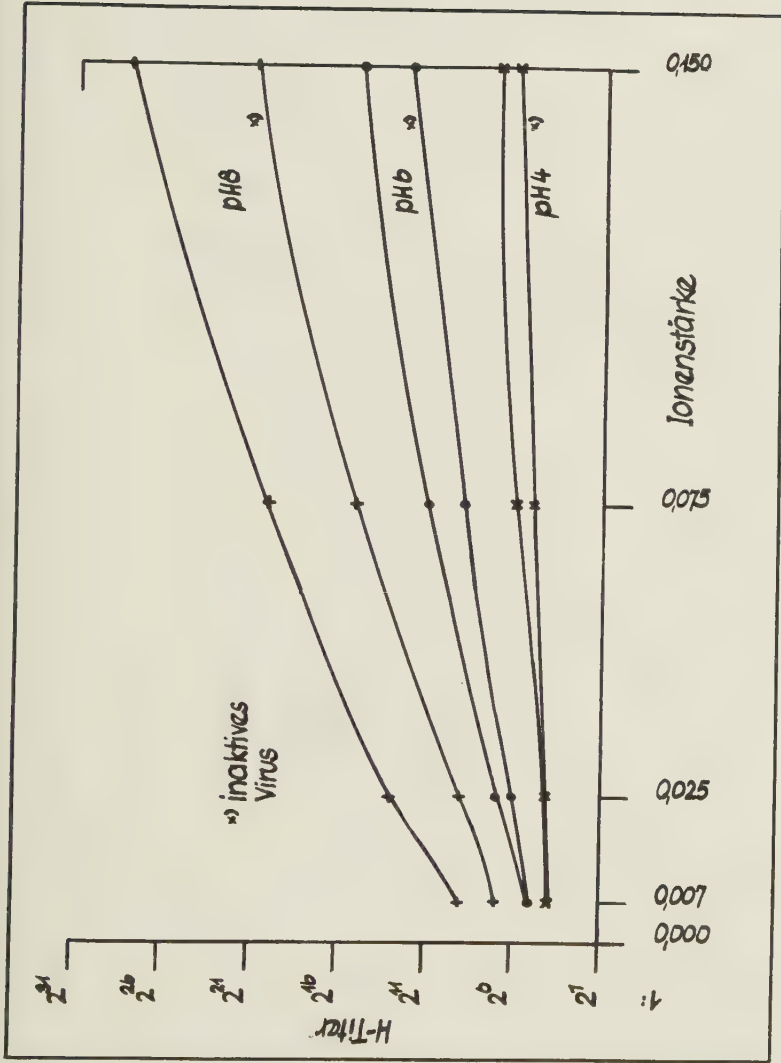


Fig. 6: Die Abhängigkeit der Haemagglutinationstiter im HIRST-Test geprüfter K. P. Virusproben von den Eigenschaften (Ionenstärke, Säuregrad) des Reaktionsmediums. Die Kurven zeigen die Titer in Medien konstanter Ionenstärke, jedoch wechselnder H-Ionenkonzentration.

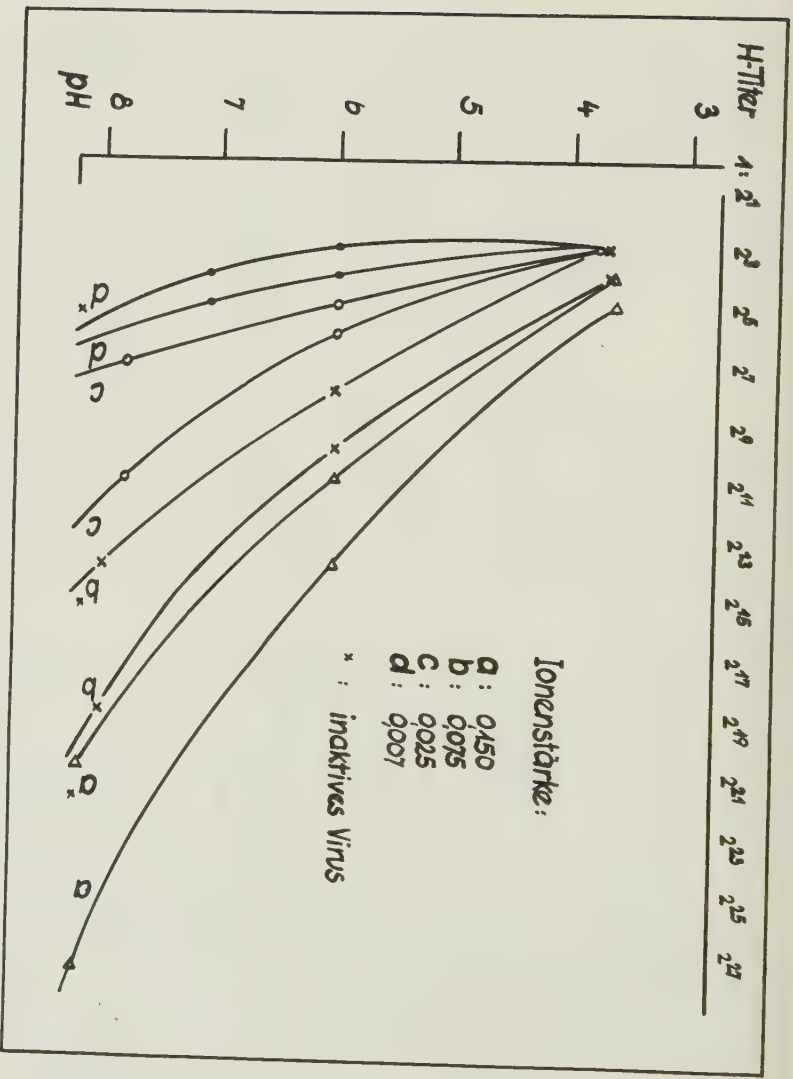


Fig. 7: Die Abhängigkeit der Haemagglutinationstiter im HIRST-Test geprüfter K.P. Virusproben von den Eigenschaften (Ionenstärke, Säuregrad) des Reaktionsmediums. Die Kurven zeigen die Titer in Medien konstanter H-Ionenkonzentration, jedoch wechselnder Ionenstärke.

Was die Bedeutung der Ionenstärke für den HIRST-Test betrifft, so könnten die angeführten Befunde von PIPER und RUHENSTROTH-BAUER (86) vielleicht mit den obigen Ergebnissen in Zusammenhang gebracht werden. (Zu denken wäre an ein dynamisches Gleichgewicht im Sinne einer partiellen, mit der Ionenstärke bzw. der unspezifischen (Protein-) Adsorption variablen "Blockierung" der Zelloberfläche für die spezifische (Virus-)Adsorption.)

F. HAUPTVERSUCHE

1. Untersuchungen von Erythrozyten nach Besetzung mit Virus

a) Die Festigkeit der Bindung von inaktiviertem Virus an die Zelle

Zunächst wurde in einem einfachen Vorversuch die Haltbarkeit der Verknüpfung von Erythrozyt und perjodatinaktiviertem Virus geprüft.

Exp. VII; Einzelheiten s. Protokoll Seite 76.)

Hierzu behandelten wir das Virus wie zur Inaktivierung üblich zuerst mit Perjodat-, dann mit Glukoselösung und setzten dem so angelegten Viruspräparat eine Zellsuspension zu. Später erfolgte in der Zentrifuge die Abschleudung und mehrmalige Waschung der roten Blutkörperchen; dabei wurden die Zellen vor jeder Abscheidung einige Zeit lang in aufgewirbeltem Zustande stehen gelassen und die Überstände jedesmal nach HIRST ausgetestet, um Virus aufzufinden, das sich trotz "Perjodierung" von der Zelloberfläche gelöst haben könnte.

Die Überstände waren durchweg virusfrei. Perjodatinaktiviertes Virus heftet sich demnach an die Erythrozytenmembran und widersteht in dieser Position auch größeren mechanischen Kräften: die adsorbierten Partikel wurden durch 6maliges Waschen des Virus-Zellkomplexes von ihrem spezifischen Rezeptor in nachweisbaren Mengen nicht entfernt.

Um zu untersuchen, ob eventuell das Virus seine Haemagglutinationskraft im Zuge der Perjodatbehandlung verloren hatte und der Virusnachweis in den Überständen aus diesem Grund mißlang, unterwarfen wir die Virus-Stamm-suspension ebenfalls der Perjodatinaktivierung nach der Standardmethode, brachten das solcherart vorbehandelte Viruspräparat jedoch vorerst nicht mit Erythrozyten in Kontakt, sondern bestimmten lediglich nach einiger Zeit seinen Haemagglutinationstiter. Es geschah dies zur Prüfung, ob das Virus im Laufe der Zeit (durch eine protahierte Wirkung des - allerdings mit Glucose versetzten - Perjodats) vernichtet oder dezimiert werden könnte. - Tatsächlich trat während der inaktivierenden Prozesse eine Reduktion der zellverklumpenden Kraft um ca. 50 % ein; nach Zugabe von Glucose veränderte sich der Haemagglutinationstiter nicht mehr.

Es war ferner denkbar, daß eluiertes Virus im Überstand sich nicht hatte nachweisen lassen. In einem weiteren Versuch wurde deshalb natives Virus mit roten Blutzellen zusammengeführt, später Medium und Zellmaterial geschieden und der Überstand nach HIRST ausgetestet. Um die neutralisierende Wirkung der Glucoselösung herauszustellen, wurde Glucose- und Perjodatlösung vereinigt, erst nachträglich ein Viruspräparat zugefügt und später nach HIRST ausgetestet.

Es zeigte sich, daß voll aktives ebenso wie solches Virus, das mit glucose-neutralisiertem Perjodat vorbehandelt worden ist, von der Oberfläche der Zellen abdissoziiert und mindestens zur Hälfte wieder nachweisbar wird. Die Irreversibilität der Virusanlagerung ist also die spezifische Folge der Perjodateinwirkung.

Über die nicht umkehrbare Anlagerung des perjodatinaktivierten (Influenza-) Virus an rote Blutkörperchen haben zuerst FAZEKAS DE ST GROTH und GRAHAM (55) berichtet; unser für den Erreger der klassischen Hühnerpest gewonnenes Resultat stimmt in qualitativer Hinsicht mit den älteren Befunden überein.

b) Die elektrokinetischen Zellveränderungen durch natives oder inaktiviertes Virus in Abhängigkeit von der Zeit

Nachdem wir uns im vorstehend wiedergegebenen Versuch von der Festigkeit der spezifischen Virus-Erythrozyten-Koppelung hatten überzeugen können, wiederholten wir den Versuch von HANIG (79), der die elektrokinetischen Alterationen an Erythrozyten während der 1. Stunde nach der Virusinfektion verfolgt hat, mit der Modifikation, daß die in der Kataphoresekammer zu untersuchenden Erythrozyten perjodatbehandeltem, d.h. der Elution unfähigem Virus ausgesetzt wurden. Zur Kontrolle führten wir auch das Original-Experiment von HANIG unter Verwendung von voll aktivem (K.P.) Virus aus.

Wir vereinigten das (perjodatinaktivierte) Viruspräparat (auf 8 bzw. $\frac{1}{8}$ agglutinierende Einheiten verdünnt) mit einer Hühnererythrozytensuspension und bestimmten fortlaufend über 90 min. in der Kataphoresekammer die Beweglichkeit jeweils einer roten Blutzelle. Ebenso verfahren wir mit den Hühnererythrozyten, die wir voll aktivem Virus (8 bzw. $\frac{1}{8}$ bzw. $\frac{1}{512}$ agglutinierende Einheiten) zugemischt hatten. (Zelldichte: 0,5 %)

(Exp. VIII; Einzelheiten s. Protokoll Seite 78.)

Fig. 8 macht das Ergebnis des Experiments anschaulich: inaktiviertes K.P. Virus ist imstande, die elektrische Ladung der Hühnererythrozytenoberfläche zu verändern. Das Ausmaß der Beweglichkeitsveränderung hängt von der aufgewendeten Virusdosis ab. Im Gegensatz dazu führt aktives Virus, unabhängig von seiner Menge, stets zu einer bestimmten Endladung der Zellmembran. Es wird also die HANIG'sche Vorstellung bestätigt, nach der sich voll aktive Viruspartikel immer wieder vom enzymatisch degradierten spezifischen Rezeptor ablösen, um alsbald an andere, bis dahin unversehrt gebliebene rezeptive Erythrozytenstrukturen heranzutreten und auch diese nach und nach restlos abzubauen und in refraktärem Zustande dahinten zu lassen. Offenbar wird das einzelne Viruspartikel durch die Perjodatbehandlung daran gehindert, stets von neuem - bis zum Abbau aller Rezeptoren - beide "Akte" des natürlichen HIRST'schen Mechanismus' (Adsorption und nachfolgende Elution) zu spielen: jedes "perjodierte" Virusteilchen tritt nur mit einem Rezeptor, und zwar endgültig, in Verbindung; die elektrische Oberflächenladung verändert sich auch dann nicht mehr, wenn noch freie Haftstellen zur Verfügung stehen. Die Beweglichkeitskurven in Fig. 8 verlaufen, nachdem sie einen der Virusmenge entsprechenden Wert erreicht haben, der Zeitachse parallel. Das sonst dynamische Geschehen ist blockiert, da die Reaktionsfolge durch die Perjodatwirkung an der Stelle unterbrochen worden ist, wo die rezeptordestruierende Phase (Elution) ihren Anfang hat.

Indem die einzelnen Virusteilchen am spezifischen Rezeptor haften bleiben, bekunden sie den Verlust gewisser fermentativer Fähigkeiten. Daß sie sich jedoch nicht bloß "physikalisch" anlagern, vielmehr durchaus irgendwie enzymatisch aktiv werden, zeigt sich an den tiefgreifenden kataphoretisch entdeckbaren Veränderungen, wobei vor allem die Gleichartigkeit von Virus- und RDE-Effekt sowie die Übereinstimmung der durch aktives und inaktives Virus bedingten maximalen Mobilitätsreduktion - im folgenden Versuch genauer bestimmt - beachtlich sind. Man kann deshalb annehmen, daß die sog. "biologische" 2. Phase der Virus-Zellreaktion einen komplexen Vorgang darstellt und sich (zumindest) in zwei distinkte funktionelle Abschnitte unterteilen läßt. Vermutlich fällt man mit den perjodatinaktivierenden Maßnahmen an der "Nahtstelle" zweier verschiedener hintereinander ablaufender fermentaktiver Mechanismen ein und stört nur die Funktion der Virusliberierung, oder aber man trifft den einen der beiden "parallel" angeordneten Mechanismen isoliert.

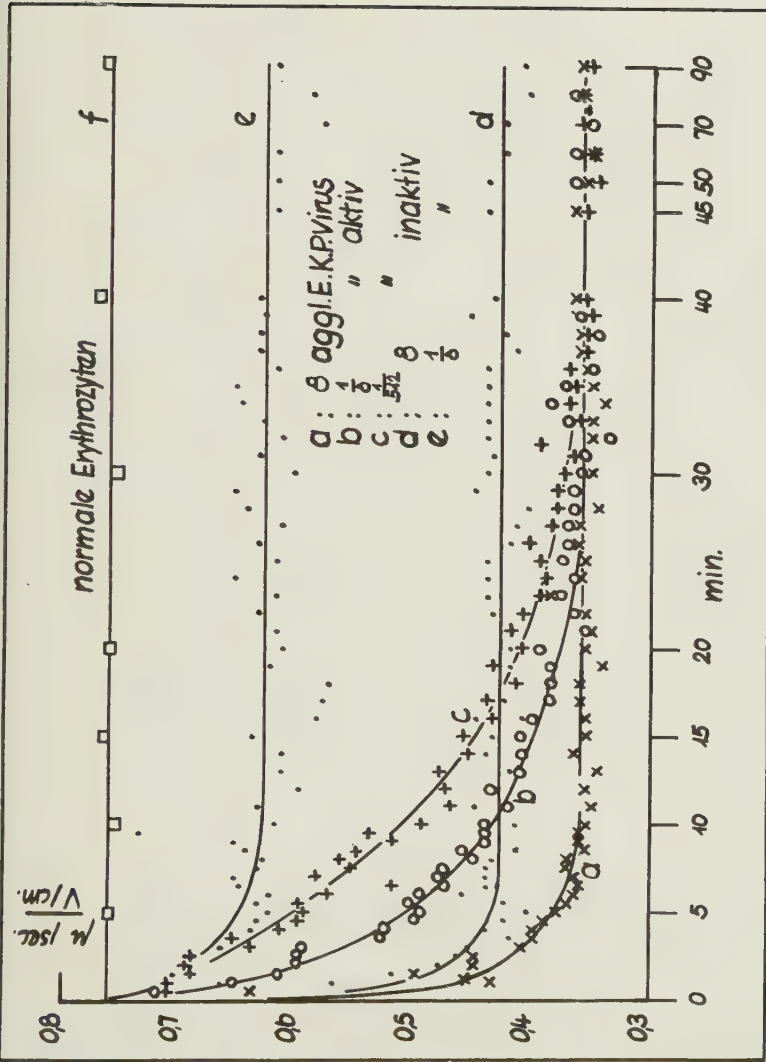


Fig. 8: Die kataphoretische Wirkung von aktivem (a, b, c) und inaktivem (d, e) K.P. Virus auf Hühnererythrozyten in der Zeit (f Kontrollmessung): nicht vorbehandelte Zellen.) nach Kontrollmessung.

c) Die elektrokinetischen Zellveränderungen durch inaktiviertes Virus in Abhängigkeit von der Virusdosis

Theoretisch ist schon mit dem ursprünglichen HANIG'schen Versuch die Möglichkeit gegeben, die haemagglutinierende Kraft eines Viruspräparats festzustellen: es ließe sich der Grad der kataphoretischen Beweglichkeitseinschränkung virusvorbehandelter Erythrozyten zu einem bestimmten Zeitpunkt messen und anhand von früher angelegten Eich Tabellen auf die Wertigkeit der Virussuspension schließen, oder man könnte die Kurve ermitteln, welche die kataphoretischen Folgen der Virus-Zellreaktion in der Zeit registriert und sie mit entsprechenden, früher erhaltenen und standardisierten Schaubildern vergleichen. In der Praxis erweist sich ein solches Verfahren jedoch als nicht durchführbar, u. a. deshalb, weil zur "Zeit X" nur eine einzige Messung ausgeführt werden kann. Wegen der Umständlichkeit und Ungenauigkeit eines solchen Vorgehens ist die Haemagglutininbemessung nach diesen Prinzipien auch nie versucht worden. - Nachdem nun aber der vorstehend beschriebene Versuch eine quantitative Beziehung zwischen der Menge irreversibel adsorbierten (inaktivierten) Virus und der Zellmobilität in "Stichproben" (s. Fig. 8) gezeigt hatte, sollte in einem weiteren Experiment die Bedeutung der Virusdosis für die Erythrozytenbeweglichkeit eingehender untersucht werden. Da am Diagramm der Fig. 8 auffällt, daß schon überraschend wenige agglutinierende Viruseinheiten eine starke Reduktion der Erythrozytenbeweglichkeit herbeizuführen imstande sind - die Mischung gleicher Teile einer 0,5 %igen Hühnerblutzellenaufschwemmung und einer auf 8 aggl. Einheiten eingestellten inaktiven K.P. Virussuspension läßt Agglutinate entstehen, die in ihrer Mobilität zu 41 % eingeschränkt erscheinen; die äußerste Beweglichkeitsminderung durch aktives Virus beträgt 51 % -, sollte überdies untersucht werden,

1. wieviel perjodativvorbehandeltes Virus an Erythrozyten insgesamt angelagert werden kann und
2. inwiefern die adsorbierte Virusmenge kataphoretisch nachweisbar ist. - Zu diesem Zweck wurden die HIRST'sche und die kataphoretische Methode parallel eingesetzt.

Eine perjodatinaktivierte, K.P. virushaltige Chorio-Allantoisflüssigkeit (Haemagglutinationstiter 1 : 128) wurde halbschlächtig in Standardpuffer verdünnt, so daß Virussuspension mit Virusdosen zwischen 128 agglutinierenden Einheiten (Nr. 1) und $\frac{1}{256}$ agglutinierenden Einheiten (Nr. 16) in 2 gleichartigen Serien zur Verfügung standen.

Jede Virusprobe der 1. Serie wurde mit einer Erythrozytensuspension gründlich vermischt und das so vorgelegte Untersuchungsgut jeweils nach 15 min. einmal in Standardpuffer gewaschen und anschließend zur Messung in die Kataphoresecuvette gegeben. - Dieselbe Vorschrift galt für eine Mischung von virusfreier Eiflüssigkeit und Erythrozytensuspension (Kontrollversuch).

Die Virusproben der 2. Serie durchliefen die gleichen Arbeitsgänge, doch wurden hier die Zellen nach Abschluß der Virusbindung abgeschleudert und die Überstände auf noch vorhandenes, d.h. nicht angelagertes Virus im HIRST-Test geprüft.

(Exp. IX; Einzelheiten s. Seite 79 .)

Das Diagramm der Fig. 9 bringt die Resultate der kataphoretischen Versuchsreihe zur anschaulichen Darstellung, während in Fig. 10 die Zahl der agglutinierenden K.P. Viruseinheiten, die den Hühnererythrozyten angeboten worden waren, der Haemagglutininkonzentration gegenübergestellt sind, wie sie nach Abschluß des Adsorptionsprozesses im Überstand festgestellt wurde.

- Es zeigt sich erneut, daß die schrittweise Erhöhung der zur Reaktion gebrachten Virusdosis, d.h. die allmähliche Verdichtung des Virusbesatzes am roten Blutkörperchen, mit steigenden Werten der Mobilitätsreduktion einhergeht. Verfolgt man den Quotienten, der aus Viruskonzentration im gemeinsamen Virus-Erythrozyten-Medium (anfangs der Reaktion) und Virusdichte im Überstand des Agglutinats (nach Abschluß des biologischen Geschehens) gebildet ist, bei wachsendem Virusangebot, so wird man an das vom Massenwirkungsgesetz allgemein angesprochene Gleichgewicht erinnert: ein bestimmter Bruchteil des zugesetzten K.P. Virus verhält sich reaktionslos.

Die sonst angegebene "quantitative Adsorption" (2) des einer Erythrozytensuspension zugemischten Virus erscheint nach diesen sowie nach unseren Versuchen zur Abhängigkeit des Haemagglutinationstiters von der Ionenstärke und dem Säuregrad des Milieus fragwürdig.

Es kann nun nicht etwa die bloße stoffliche Anwesenheit des Virusteilchens für die Einschränkung der elektrophoretischen Beweglichkeit einer im übrigen intakten, strukturellchemisch unveränderten Zelle verantwortlich gemacht werden. Dies wird bewiesen, wenn man die Resultate der mitgeführten Haemagglutinationstests (Fig. 10) in die Betrachtung einschließt: die Adsorption von Virus an Erythrozyten ist auch dann noch möglich, wenn die Zellen auf die Verstärkung der Virusbesetzung kataphoretisch nicht mehr ansprechen, denn das Minimum der Beweglichkeit einer mit zunehmenden Virusmengen behandelten roten Blutzelle wird, wie es Fig. 10 verdeutlicht, viel früher

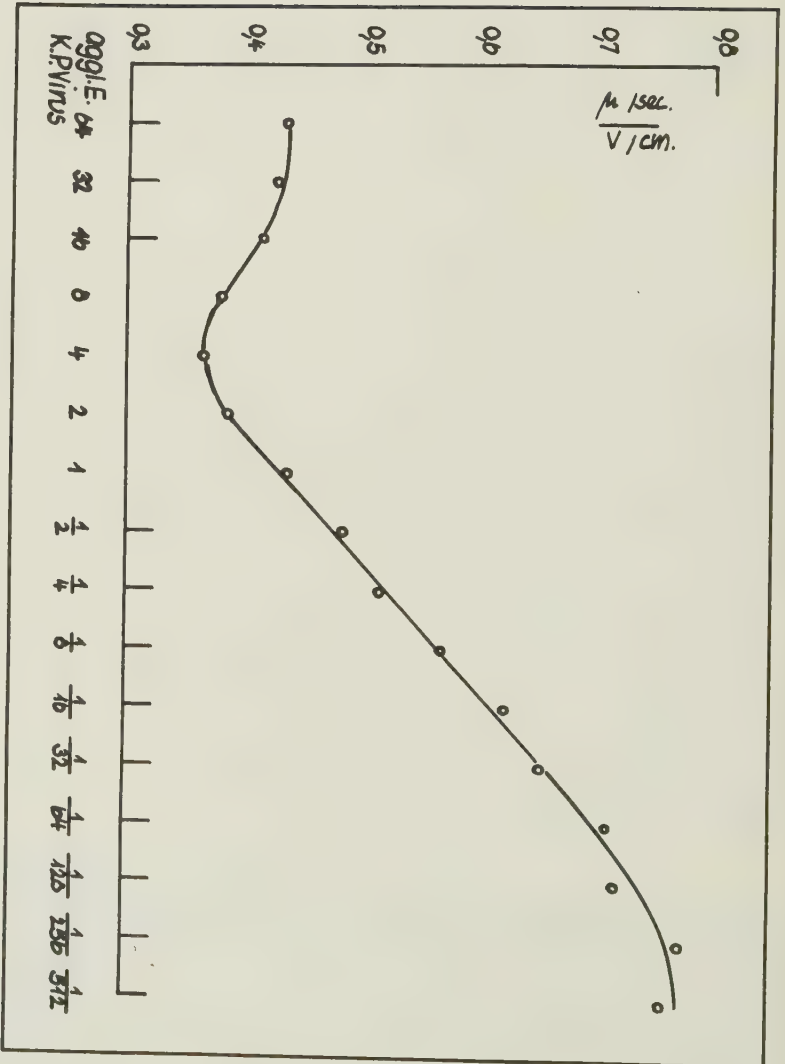


Fig. 9: Die elektrophoretische Beweglichkeit der Hühnererythrozyten in Abhängigkeit vom K. P. Virusangebot

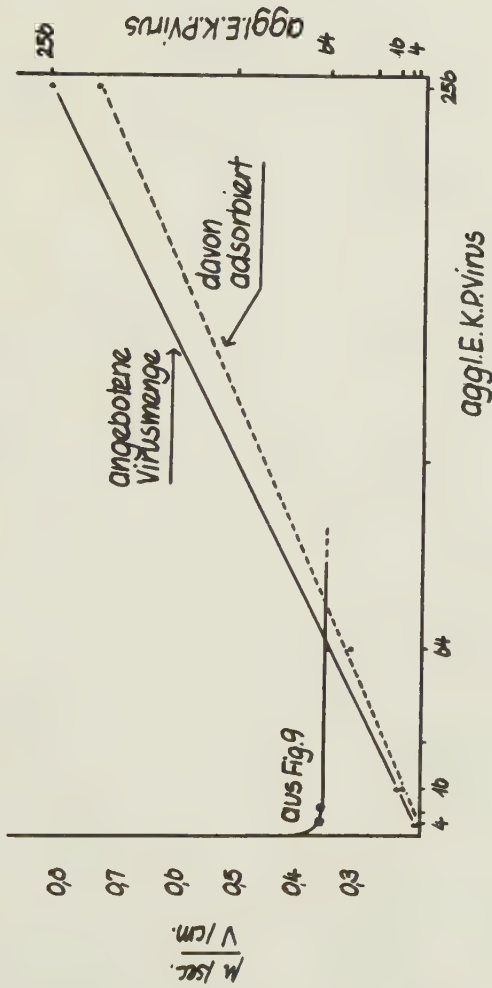


Fig. 10: Das Verhältnis von angebotenem zu an Hühnererythrozyten adsorbiertem K.P. Virus. - Aus Fig. ist die Mobilitätskurve übernommen worden, um das Ausmaß der "spezifischen" und der "unspezifischen" Virusanheftung zu vermittelten.

erreicht als die obere Grenze der adsorptiven Kapazität. Die "überschießende" Virusfixation, die ja keine elektrophoretische Mobilitätsminderung mehr bewirkt und in dieser und damit in enzyrobiologischer Hinsicht irrelevant ist, kann als nicht reaktive, "unspezifische", "physikalische" Virusbindung angesprochen werden.

Wichtig ist auch die Beantwortung der Frage, in welcher Größenordnung die Dosen inaktivierter Erreger genommen werden müssen, um die maximale Einschränkung der Erythrozytenbeweglichkeit zu veranlassen. Überraschenderweise reichen schon 8 agglutinierende Viruseinheiten aus, um an der Zellmembran das Maximum der Mobilitätsreduktion zu bewirken.

d) Der Einfluß von Perjodat auf das Zellpotential

An der Kurve in Fig. 9 fällt die mit steigenden Virusdosen gegenüber dem einmal erreichten Mobilitätsminimum wieder erhöhte kataphoretische Zellgeschwindigkeit auf. Bei der Suche nach der Ursache für diesen Umstand prüften wir u. a. auch das zur Vorbehandlung des K.P. Virus verwendete Natriumperjodat bzw. auf die der Reaktion mit Glukose entspringenden Spaltprodukte. Diese Substanzen wurden in unserem Experiment zwangsläufig mit den Erregern zusammen an die Erythrozyten herangebracht, und zwar in ungleichen (steigenden) Konzentrationen. - Im folgenden Versuch gingen wir der Frage nach, ob das zur Beseitigung der eluierenden Virusqualität dienende Natriumperjodat unter den Bedingungen der routinemäßigen Virusinaktivierung seinerseits eine Veränderung der Zellbeweglichkeit hervorruft.

Wir verglichen hinsichtlich des spezifischen kataphoretisch faßbaren Effektes auf die Hühnererythrozytenmembran die folgenden beiden Flüssigkeiten mit der "perjodierten" virushaltigen Chorio-Allantoisflüssigkeit. -

1. Um den Einfluß der Perjodat-Glukosemischung von der Wirksamkeit des Virus zu trennen, wurde anstelle der Virussuspension 0,85 %ige Kochsalzlösung eingeführt, im übrigen jedoch nach der Standardmethode zur Virusinaktivierung verfahren.
2. Um den Effekt des Natriumperjodats und der Spaltprodukte (s.o.) auseinander zu halten, vertrat in einem 2. Ansatz die Kochsalzlösung nicht nur die erregerehaltige Chorio-Allantoisflüssigkeit, sondern auch die isotonische Glukoselösung; sonst entsprach die Mischung der 1. Flüssigkeit. -

Beide Lösungen wurden - wie sonst die Viruspräparate - halbschlüchtig verdünnt und unter Einhaltung der in den vorigen Versuchen geübten Methodik an Erythrozyten gegeben.

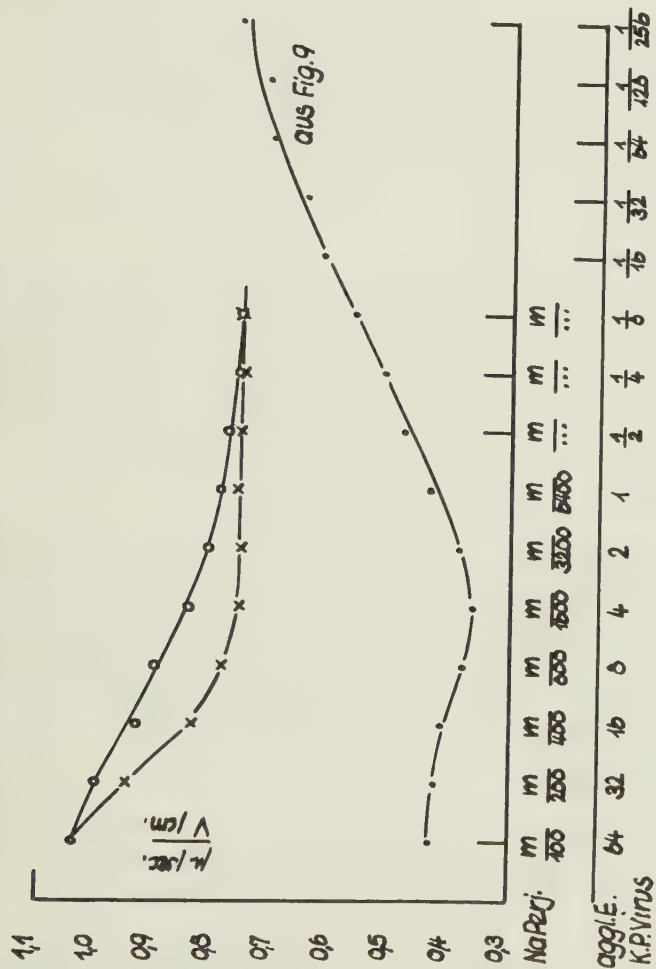


Fig. 11: Der "Perjodateffekt". - x-x-x-: Perjodat-Glukose-Mixtur zu nativen Erythrozyten. o-o-o-: Perjodat zu nativen Erythrozyten.

Exp. X; Einzelheiten s. Protokoll Seite 80 .)

Fig. 11 zeigt das Resultat dieses Versuchs, das im Nachweis eines Mobilitätssteigernden Einflusses auf die roten Blutkörperchen in Abhängigkeit von der Konzentration sowohl für Natriumperjodat als auch für die Perjodat-Glukose-Mixtur besteht. Zur Beurteilung der quantitativen Verhältnisse ist aus Fig. 9 die Mobilitätskurve übernommen worden; offenbar kann ein "Perjodateffekt" für die relative Beweglichkeitssteigerung solcher Hühnererythrozyten, die mit den jeweils höchsten Konzentrationen von perjodatinaktiviertem K.P. Virus in Kontakt getreten waren, verantwortlich gemacht werden. Hier sind auch die Konzentrationen des Perjodats noch hoch genug, um kataphoretisch wirksam zu werden.

Da Glucose durch Perjodat zu Formaldehyd und Ameisensäure oxydiert wird, versuchten wir, den wirksamen Faktor des Natriumperjodat-Glukosegemisches sowie dessen Wertigkeit in einem einfachen Versuch zu bestimmen. - Wir prüften in jeweils einer Routinemessung (10 Einzelbestimmungen) die kataphoretische Wirkung von Formaldehyd 33 % und Ameisensäure 300,0 auf im Verhältnis 1 : 1 bzw. 1 : 10 zugegebene Hühnererythrozytensuspensionen.

(Exp. XI; Einzelheiten s. Protokoll Seite 81 .)

Bei Standardbedingungen ergab sich nach Formaldehydzusatz eine Erhöhung der Erythrozytenmobilität auf 194 % der normalen Zellbeweglichkeit, nach Zugabe von Ameisensäure eine solche auf 360 %. - Diese Feststellungen sind umso auffälliger, als wir in den hier verwendeten chemischen Substanzen die einzigen bislang bekannten Stoffe vor uns haben, welche die normalerweise schon erhebliche elektrische Ladung der Erythrozytenmembran noch weiter zu steigern vermögen.

e) Der elektrokinetische Effekt des nativen Virus auf die perjodatvorbehandelte Erythrozytenmembran in Abhängigkeit von der Virusdosis

Zur Kontrolle der Befunde behandelten wir die roten Blutzellen mit einer konstanten Perjodatdosis vor und bestimmten danach ihre elektrophoretische Mobilität nach Belegung mit einem Virus, das nicht mit Perjodat versetzt worden war. Es ist nämlich schon seit langem bekannt, daß die "Perjodierung" der Erythrozyten eine Zellmembran zurück läßt, von der die angelagerten Virus-

partikel nicht abdissoziieren (109). (Wahrscheinlich verändert das Perjodat jene chemischen Strukturen am Rezeptor, die normalerweise als Reaktionspartner des - ebenfalls perjodatempfindlichen - "Elutionsferments" fungieren.)

Wir nützten diese Erfahrung und adsorbierten an "perjodierte" rote Blutkörperchen voll aktives Virus, und zwar gaben wir solche Erythrozyten zur Messung in die Kataphoresekammer, die mit Flüssigkeiten gleicher Perjodat-, jedoch verschiedener (steigender) Viruskonzentration vorbehandelt worden waren.

(Exp. XII; Einzelheiten s. Protokoll Seite 81 .)

In Fig. 12 sind die Meßergebnisse dieses Experiments als Punkte einer Kurve eingetragen, deren Verlauf die Relation von aufgebotener Virusmenge und elektrophoretischer Erythrozytenbeweglichkeit auch für die hier gewählten Versuchsbedingungen erkennen läßt. - Beim Vergleich mit normalen Zellen imponiert zunächst die erhebliche elektrophoretische Mobilität derjenigen roten Blutkörperchen, die mit minimalen oder wirkungslosen Virusdosen in Berührung gekommen sind; ferner fällt die erhöhte elektrophoretische Beweglichkeit der maximal virusbeladenen Erythrozyten (im Vergleich mit den sonst erreichten äußersten Mobilitätsreduktionen) auf. In qualitativer Hinsicht zeichnet sich das Schaubild durch das Fehlen eines Scheitelpunktes aus (vgl. Fig. 9). - Diese Feststellungen dürfen als eine Bestätigung der Ansicht gewertet werden, daß die z.B. im Exp. IX beobachtete erhöhte Mobilität der dicht virusbesetzten roten Blutzellen von der beigemischten Perjodat-Glukose-Mixtur herrührt. Die in Fig. 12 gezeichnete Kurve erscheint, vergleicht man sie mit der in Fig. 9 gegebenen, kongruent; sie ist jedoch um einen Betrag verschoben, der am Diagramm in Fig. 11, ausgehend von der verwendeten Perjodatkonzentration, als Maßzahl der perjodatbedingten Oberflächenalteration ("Perjodateffekt") abgelesen werden kann. Diese rechnerische Beziehung ist jedoch lediglich qualitativ aufschlußreich; Anspruch auf quantitative Verbindlichkeit kann sie nicht erheben, da im einen Fall inaktiviertes, im anderen Fall aktives Virus die Beweglichkeitsminderung verursacht hat.

Demnach verursacht sowohl aktives als auch inaktives Virus einen kataphoretischen Effekt, wobei überraschenderweise gleiche Virusdosen eine gleich hohe prozentuale Ladungsreduktion veranlassen. - Der Versuch zeigt ferner, daß eine 8 agglutinierende Einheiten übertreffende Viruskonzentration auch dann keine weitere Ladungsminderung auszulösen vermag, wenn die "antagonistische" Perjodatkonzentration ausgeschaltet worden ist.

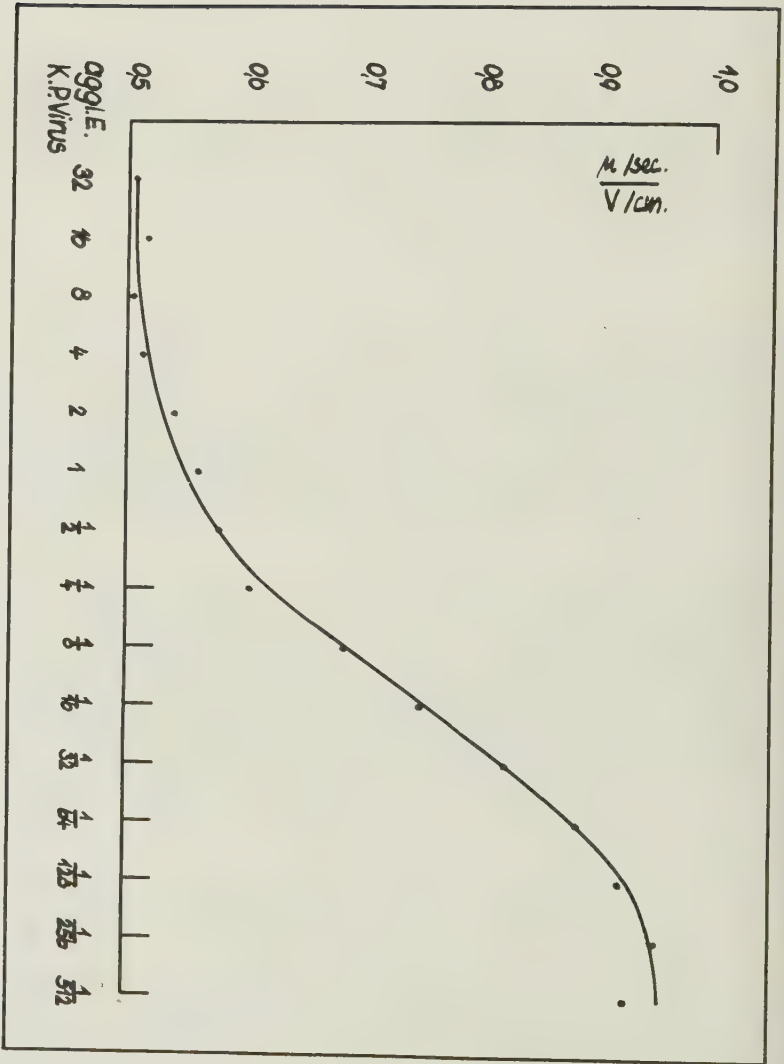


Fig. 12: Die elektrophoretische Beweglichkeit von periodatbehandelten Erythrozyten in Abhängigkeit von nativem Virusangebot.

f) Der elektrokinetische Effekt des perjodatinaktivierten Virus auf die perjodatvorbehandelte Erythrozytenmembran

Ein weiterer Versuch sei nur kurz besprochen; er ergänzt das vorstehend referierte Experiment und sichert die Kenntnisse vom "Perjodateffekt", indem er dieses Problem von einem neuen Standpunkt aus avisiert: (Exp. XIII) Wir behandelten die zur Beschickung der Kataphoresekammer vorgesehenen Hühnerythrozyten mit Natriumperjodat stufenweise fallender Konzentration vor und boten ihnen dann Virusproben einer 1. Reihe mit konstanter höherer Dosis (2 agglutinierende Einheiten) und einer 2. Reihe mit konstanter niedrigerer Dosis ($\frac{1}{4}$ agglutinierende Einheit) an. (Diese K.P. Viruspräparate waren zwar "perjodiert", doch ist dem Diagramm in Fig. 10 zu entnehmen, daß der Einfluß der Perjodat-Glukose-Mixtur auf die Zellmobilität in diesen Verdünnungen geringfügig bleibt.) - Das Vorgehen entspricht, von der zusätzlichen Virusadsorption an die "perjodierten" Erythrozytenmembranen abgesehen, dem Verfahren, wie es für Exp. X beschrieben wurde. Die dort erhaltene Kurve wird in Fig. 13 zum Vergleich aufgeführt.

Der (nur im Schaubild vorgewiesene) Versuch zeigt, daß nach Perjodatbehandlung beider Partner die Reaktion abläuft wie nach "Perjodierung" nur des einen. Er bestätigt die bislang erhobenen Befunde und kann zur qualitativen und quantitativen Kontrolle der übrigen Experimente dienen. (Man vergleiche das nicht durch "Perjodierung" "verfälschte" Beweglichkeitsniveau für die hier gewählten Viruskonzentrationen (von 2 agglutinierenden Einheiten (a) und $\frac{1}{4}$ agglutinierende Einheit (b) mit dem früher (in Exp. IX) aufgefundenen, das Ausmaß der Perjodatwirkung mit dem zuvor (in Exp. X) festgestellten usw.).

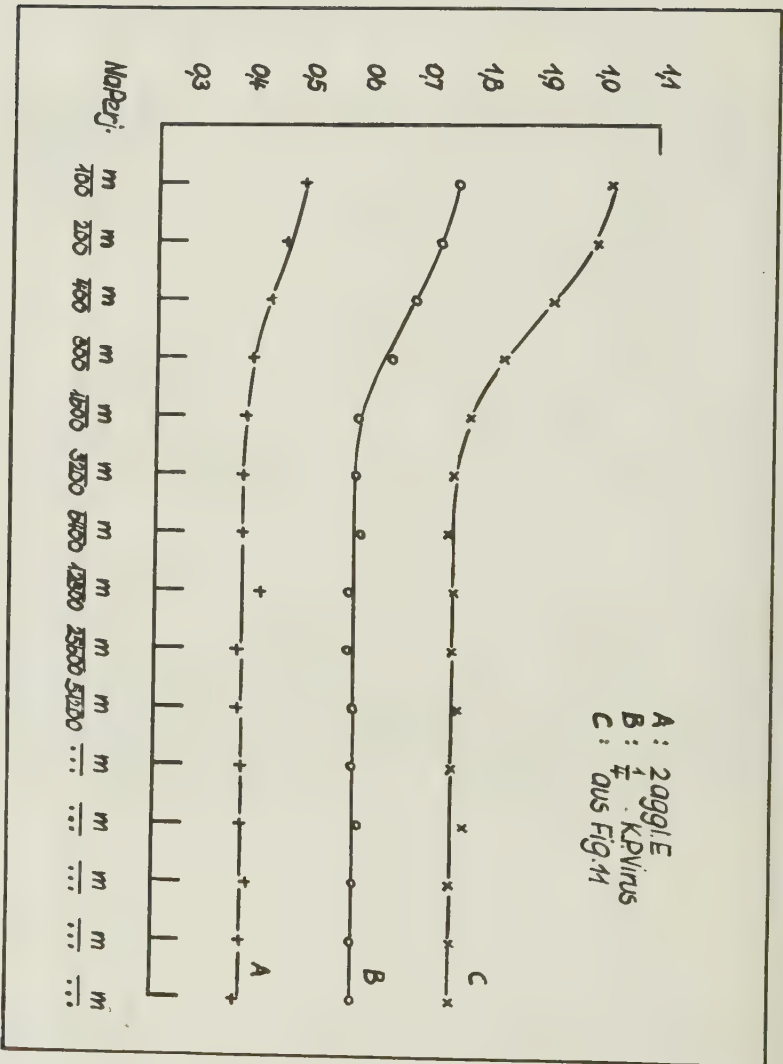


Fig. 13: Der "Perjodateffekt" auf K.F. virusvorbehandelte Hühnererythrozyten.

2. Untersuchung virusbesetzter Erythrozyten nach Behandlung mit Antiseren

Die Ergebnisse der bislang beschriebenen Versuche sind im wesentlichen die folgenden:

1. Es gelingt, inaktiviertes K.P. Virus irreversibel an Hühnererythrozyten zu binden.
2. Durch die Anheftung des Virus reduziert sich die elektrophoretische Zellbeweglichkeit.
3. Die Mobilitätsminderung ist von der Virusdosis abhängig.
4. Die maximale Beweglichkeitseinschränkung läßt sich schon bei Anwendung weniger agglutinierender Viruseinheiten erreichen. Voll aktives und inaktiviertes Virus vermögen etwa die gleiche Mobilitätsreduktion zu veranlassen.
5. Perjodat und seine Reaktionsprodukte erhöhen das elektrokinetische Zellpotential, so daß bei der Beurteilung aller von "perjodiertem" Virus beeinflussten kataphoretischen Werte der "Perjodateffekt" zu berücksichtigen ist.

Das Ziel der im folgenden dargestellten Experimente bestand darin, die vorgängig mit Virus besetzten Zellen in einem zweiten Schritt mit dem virus-spezifischen Antikörper zusammenzuführen und die kataphoretischen Folgen zu messen. Es sollte damit die Möglichkeit einer virusspezifischen Reaktion untersucht werden; Zellmobilitätsverminderungen können nämlich die vielfältigsten, auch nicht virusspezifischen, Ursachen haben.

Aufgrund unserer heutigen Vorstellungen ließ sich nicht auf die "biologische Notwendigkeit" einer Antigen-Antikörper-Reaktion unter den Bedingungen unseres Versuch schließen. Der Hoffnung auf Eintritt einer spezifischen, zur Verkettung des Antikörpers mit den festhaftenden Viruspartikel führenden Wechselwirkung stand (wie sich später erwies: scheinbar) entgegen, daß ein Virusteilchen sein haemagglutinierendes, d.h. zellgerichtetes Vermögen dann einbüßt, wenn vorher seine antikörperbindende Fähigkeit in Anspruch genommen worden ist (Prinzip des Hemmungstests). Es war denkbar, daß umgekehrt nach erfolgter Haemagglutination die Antikörperbindung ausfällt.

Der Nachweis, daß virusspezifische Antikörper mit perjodatvorbehandeltem Virus überhaupt reagieren, ist eingangs geliefert worden (s. Vorversuche: Vergleich der Hemmtiter eines Antiserums bei Gebrauch von aktivem und

inaktiviertem Testvirus). - In einem weiteren Versuch (Exp. XIV; s. Protokoll Seite) gaben wir zu virusbesetzten Zellen Virus-Antiserum: es wurde von der fixierten Virusmenge genau so stark neutralisiert wie von einer gleich großen, nicht zellgebundenen. Dieser einfache Vorversuch bewies allerdings nicht, daß die spezifischen Antikörper sich dem Zell-Virus-komplex anlagern; eventuell hatte eine antikörperbedingte Viruslösung von der Erythrozytenmembran stattgefunden. Um zu untersuchen, ob die immunologische Reaktion an der Zelloberfläche abläuft, wurden die folgenden Experimente ausgeführt.

a) Unspezifische elektrokinetische Wirkungen von Antiseren

In Vorversuchen prüften wir die Wirkung verschiedener Kontrollseren auf das elektrokinetische Potential der roten Blutzellen, um Auskunft über nicht virusspezifische kataphoretisch hervortretende Erscheinungen zu erlangen. (Exp. XV; Einzelheiten s. Protokoll Seite 83).

Hierzu versetzten wir frische, also nicht virus-besetzte Erythrozyten mit routinemäßig inaktiviertem virusspezifischem Antiserum oder Kontrollimmunserum oder normalem Kaninchenserum (s. Kapitel: Material und Methoden), ließen das Gemisch 30 min. lang stehen und maßen die danach gewaschenen Zellen anschließend in der Kataphorese-Kammer. Alle 3 Seren bewirkten an Erythrozyten sämtlich eine Mobilitätsreduktion um etwa 30 % des Normalwertes, ohne daß eine Zellverklumpung oder eine andere augenscheinliche Veränderung der roten Blutkörperchen zu beobachten gewesen wäre.

Eine Erythrozytenaufschwemmung wurde mit einer voll aktiven Viruspen-sion vermischt und während einer längeren Frist im Brutschrank stehen gelassen, um den Erregern Gelegenheit zur spontanen Elution zu geben; danach erfolgte Abschleuderung, Waschung in großen Flüssigkeitsvolumina und Prüfung des einen Teils der roten Blutkörperchen in der Kataphorese-Kammer. Der andere Teil wurde jeweils mit einem der erythrozytenvorbehandelten Kontrollseren (s.o.) zusammengebracht und nach einiger Zeit ebenfalls kataphoretisch ausgewertet. Die Beweglichkeit der Erythrozyten lag um 40 % tiefer als der Normalwert. Nach Abschluß der Virustätigkeit hatten sich die roten Blutzellen in der Kataphorese-Kammer mit $0,374 \frac{\mu/\text{sec.}}{\text{Volt/cm}}$ bewegt; zum Vergleich s. Exp. IX).

Endlich gaben wir an frische sowie an virusvorbehandelte Erythrozyten Proben des normalen Kaninchenserus, welches vorher sowohl mit nativen als auch

mit virusvorbehandelten Zellen in Kontakt gestanden hatte und fanden nunmehr (nach Waschung und Suspendierung) keine Veränderung des elektrokinetischen Oberflächenpotentials.

Kaninchenserum führt demnach einen gegen den Hühnererythrozyten gerichteten Heteroantikörper, der sich an den (überschüssig zugemischten) Zellen niederschlägt. Ferner wird bekanntlich (87) durch die Virusaktivität an der Erythrozytenoberfläche das sog. T-Antigen freigelegt, das mit dem in fast allen Seren vorkommenden Panagglutinin reagiert (FRIEDENREICH-THOMPSEN-Phänomen); in unserem Experiment wurde dieser Antikörper kataphoretisch nachgewiesen. - Wie der vorstehend beschriebene Versuch zeigt, können und müssen die Seren vor ihrer Verwendung zu den geplanten Experimenten von den kataphoretisch relevanten Antikörpern durch Adsorption an große Mengen normaler und virusvorbehandelter, aber virusfreier Erythrozyten befreit werden.

b) Virusspezifische elektrokinetische Wirkungen von Antiseren auf virusbesetzte Erythrozyten

Im anstehenden Experiment sollte untersucht werden, ob durch Zufuhr virus-spezifischer Antikörper an virusbesetzten Zellen ein kataphoretisch meßbarer Effekt ausgelöst wird. - Wir versetzten gleichmäßig (in 3 "Virusstärken") virusvorbehandelte Erythrozyten mit Proben schrittweise steigender Antikörperkonzentration und bestimmten die elektrophoretische Beweglichkeit des Reaktionsprodukts in der Meßkammer. Das verwendete Virusantiserum war vorgängig zweimal an rote Hühnerblutzellen adsorbiert worden, um Hetero- und Panagglutinine daraus zu entfernen.

Exp. XVI; Einzelheiten s. Protokoll Seite 85 .)

Die Werte der elektrophoretischen Beweglichkeit erscheinen im Diagramm der Fig. 14 als Punkte dreier Kurven. Es zeigt sich, daß durch die Behandlung eines Zell-Virus-Komplexes mit virusspezifischem Antiserum die elektrophoretische Mobilität der in der Kataphorese-Kammer beobachteten Teilchen herabgesetzt wird. Diese Beweglichkeitseinschränkung steht in quantitativer Beziehung zur Zahl der angebotenen spezifischen Antikörpereinheiten. Der maximale kataphoretische Effekt des virusspezifischen Antiserums prägt sich offenbar nach Maßgabe der vorgängigen Virusbesetzung aus (s. Fig. 14: die Kurven erreichen ihr jeweiliges Minimalniveau über verschiedenen Antikörper-Konzentrationsmarken). - Die mobilitätsreduzierende Wirkung der Serumbehandlung ist nur verständlich, wenn man unterstellt, daß die Viruspartikel ihren Standort an der Erythrozytenmembran während

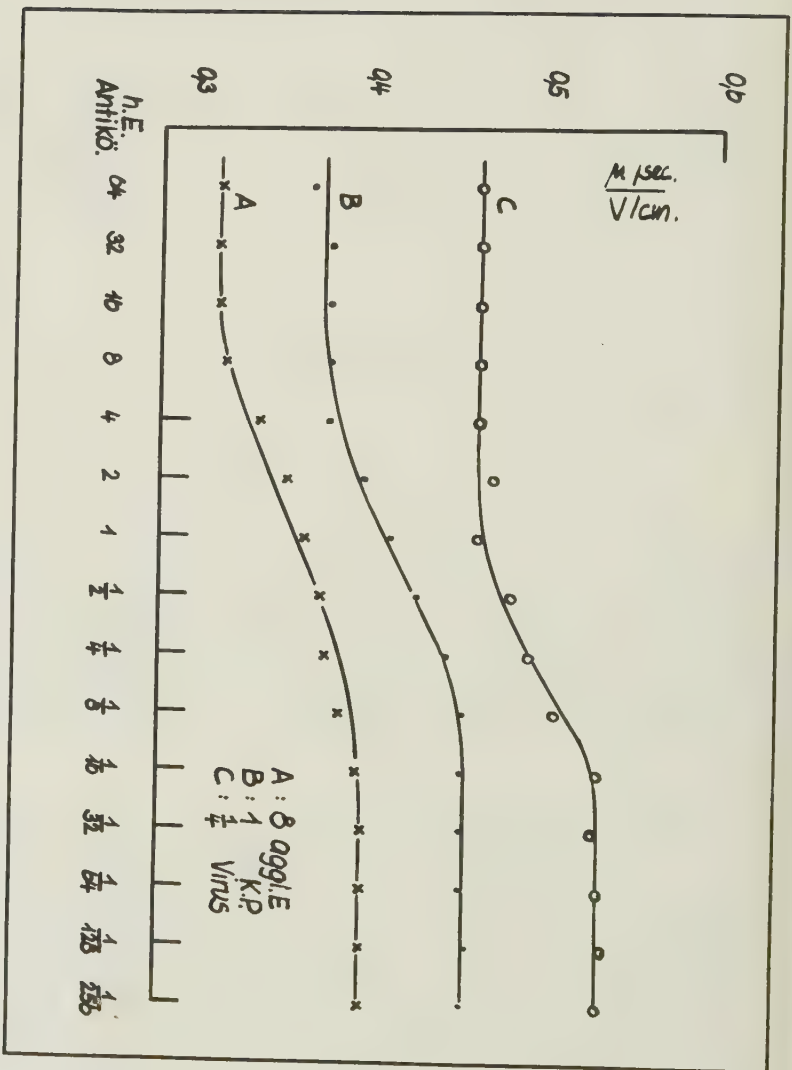


Fig. 14: Die elektrophoretische Beweglichkeit der Hühnererythrozyten in Abhängigkeit vom Virus- und Antikörperangebot

der immunologischen Reaktion nicht verlassen. Damit ist gezeigt, daß das Virus auch nach Inanspruchnahme des haemagglutinierenden Prinzips zur Antikörperbindung fähig ist.

Dem Schaubild in Fig. 14 ist außerdem zu entnehmen, daß schon $\frac{1}{4}$ bzw. $\frac{1}{2}$ hemmende Antikörpereinheit mit Hilfe der kataphoretischen Methode nachgewiesen werden kann und die qualitative Antikörperprobe an vollständig virus-okkupierten Erythrozyten sich für Seren, die $\frac{1}{4}$ ($\frac{1}{2}$) bis 16 hemmende Einheiten führen, quantitativ differenzieren läßt. (Der Übersichtlichkeit wegen bezeichnet hier 1 Hemmeinheit die Antikörperdosis, die nur 1 Viruseinheit an der Entfaltung ihrer haemagglutinierenden Aktivität hindert.) Dies bedeutet aber, daß 8 agglutinierende Viruseinheiten sich an der Erythrozytenmembran mit etwa 32 hemmende Antikörpereinheiten verbinden und das Verhältnis von Virus- zur Antikörperanteil am Zell-Virus-Antikörper-Komplex, gemessen in den jeweils charakteristischen Meßeinheiten, durchweg 1 : 4 beträgt.

c) Der spezifische und quantitative Nachweis des Virus mit Hilfe der kataphoretischen Methode

Die unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit solcher Zell-Virus-Antikörper-Verbände, denen bei ihrer Konstituierung die gleichen Antiserumverdünnungen, aber differente Virusmengen angeboten worden sind (s. Fig. 14), ließ es denkbar erscheinen, daß Virus nicht nur spezifisch, sondern auch quantitativ in der Kataphorese-Kammer nachgewiesen werden kann. - Im folgenden Experiment, dem "Gegenstück" zum vorhergehenden, sollte dies versucht werden. Dabei bestimmten wir zunächst die minimale K.P.Virusdosis, welche notwendig ist, um ein Antiserumpräparat als positiv zu charakterisieren. Jene kleinste Virusmenge, zureichend, um das native rote Blutkörperchen zum "Testerythrozyten" zu promovieren, wäre also mit Hilfe der kataphoretischen Methode allenfalls noch nachweisbar. Weiterhin und gleichzeitig sollte der "Virusstärken"-Bereich abgesteckt werden, in dem eine quantitative spezifische Virusprobe in möglich ist. - Wir maßen die kataphoretische Beweglichkeit von Hühnererythrozyten, die mit steigenden Virus-, jedoch konstanten Antikörperdosen (inaximal effektiver und mittlerer Konzentration) behandelt worden waren.

(Exp. XVII; Einzelheiten s. Protokoll Seite 86 .)

In Fig. 15 ist das Ergebnis des Versuchs als Diagramm wiedergegeben.

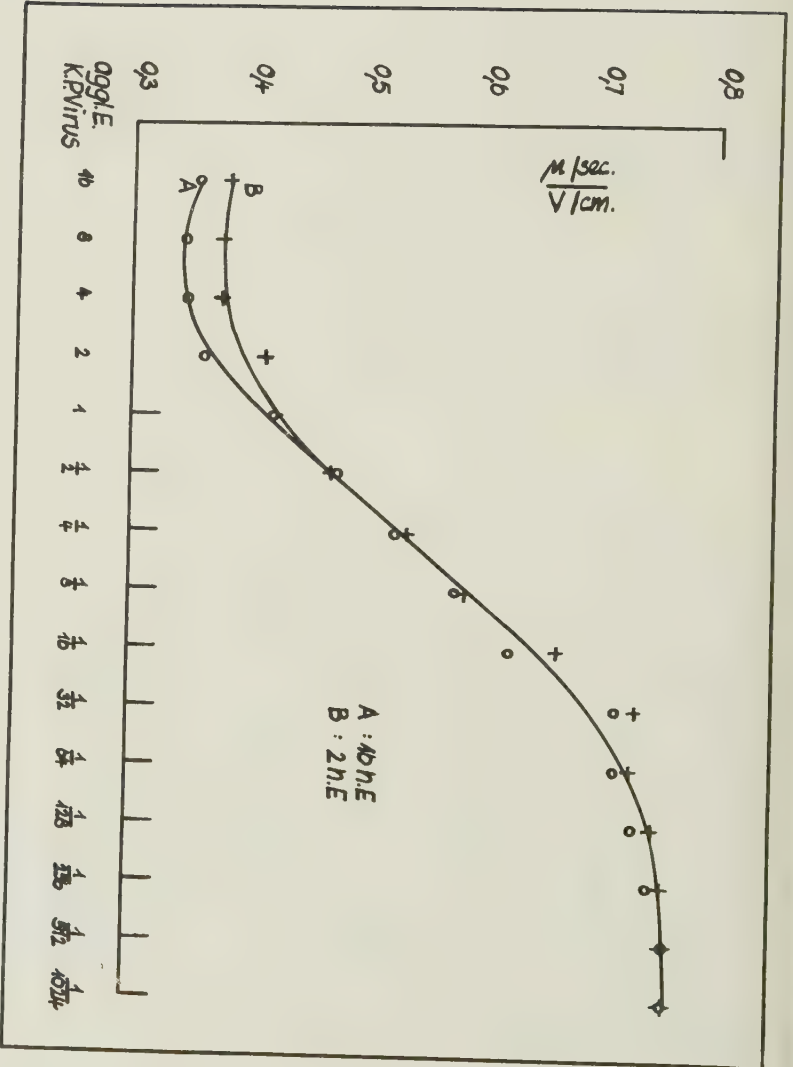


Fig. 15: Die elektrophoretische Beweglichkeit der Hühnererythrozyten in Abhängigkeit von der Virusbesetzung bei gleichbleibendem Antikörperangebot

Das (nach Auskunft des Exp. IX) in Medien hoher Virusdichte "physikalisch" an das rote Blutkörperchen adsorbierte Virus dürfte durch die Neutralisation mit spezifischen Antikörpern wieder von der Zellmembran entfernt werden. Für diese Annahme spricht jedenfalls die Feststellung, daß überschüssig zugesetzte Antikörper an solchen Erythrozyten keine Änderung des elektrokinetischen Potentials herbeizuführen vermögen, deren Rezeptoren nicht nur mit Virus vollständig abgesättigt sind, sondern an deren Oberfläche eine erhebliche Zahl von "unspezifisch" angelagerten Erregern vermutet werden muß (s. Fig. 15: bei anschließender Verwendung hochwertiger Antikörperpräparate wird das Minimum der elektrophoretischen Beweglichkeit schon durch die Vorbehandlung der Hühnererythrozyten mit 8 agglutinierenden K.P. Viruseinheiten (Maximum der "spezifischen" Virusanheftung; s. Exp. IX) erreicht. Blieben die der Neutralisationsreaktion zwischen "physikalisch" adsorbierten Viruspartikeln und spezifischen Antikörpern entspringenden Produkte unmittelbar an der Zelloberfläche sitzen, so würde sich dies bei einem Virusangebot, das 8 agglutinierende Einheiten übersteigt, wahrscheinlich kataphoretisch in einer weitergehenden Mobilitätsverminderung zu erkennen geben.)

d) Kontrollversuche

Um die Spezifität der beobachteten Erscheinungen zu sichern und verfälschende oder störende Einflüsse auf die kataphoretischen Meßergebnisse qualitativ wie quantitativ zu entdecken und, womöglich, auszuschalten, führten wir bei der Abwicklung der vorstehend beschriebenen Experimente die notwendigen Kontrollversuche durch. Diese Prüfungen wurden abschließend zusammengefaßt und wiederholt.

(Exp. XVIII; Einzelheiten s. Protokoll Seite 88.)

Die Resultate der Kataphorese-Versuche bestätigen die früher erhobenen Befunde. - Die Unabhängigkeit des mobilitätssteigernden "Perjodateffekts" von den im Zell-Virus-(Antikörper-) präparat vorhandenen Materialien zeigt sich darin, daß Natriumperjodat und "perjodierte" nicht infektiöse Eiflüssigkeit das elektrokinetische Potential der Erythrozytenoberfläche gleichmäßig erhöhen und spätere Zufuhr adsorbierten Antiserums ohne kataphoretisch wahrnehmbare Folgen bleibt (Versuche 2, 4, 12). Erregerfreie Chorio-Allantoisflüssigkeit vermag die elektrophoretische Beweglichkeit nativer roter Blutkörperchen nicht zu verändern, während die Vorbehandlung der Erythrozyten mit 4 agglutinierenden Viruseinheiten eine offensichtlich spezifisch bedingte Reduktion der normalen elektrophoretischen Zellmobilität nach sich zieht (Versuche 3, 5).

Erythrozyten, die in nicht adsorbiertem Kontrollimmun- oder Antiserum exponiert worden sind, weisen eine Minderung der ursprünglichen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit auf (Hetero- und Panagglutination), wogegen adsorbierte Seren kataphoretisch wirkungslos bleiben (Versuche 6, 8, 7, 9). Da ein unter Anlagerung von 4 agglutinierenden Viruseinheiten aufgebauter Zell-Virus-Komplex, dessen elektrokinetisches Oberflächenpotential gegenüber dem Normalwert eingeschränkt ist (Versuch 5), auf die Behandlung mit Kontrollimmunserum nicht anspricht, das Angebot adsorbierten, überschüssigen Antiserums aber mit einer maximalen elektrophoretischen Mobilitätsreduktion beantwortet, kann die Spezifität der virusabhängigen Antikörperwirkung auf die elektrophoretische Zellbeweglichkeit als gesichert gelten (Versuche 10, 11). (Das Ausmaß der Heterospezifität dürfte dem von serologischen Untersuchungen her bekannten entsprechen). - Native Hühnererythrozyten wanderten in der Meßkammer stets mit etwa $0,770 \frac{\mu/\text{sec.}}{\text{Volt/cm}}$ (Normalwert) (Versuche 1, 13).

- e) Der Einfluß der H-Ionenkonzentration auf die spezifischen elektrokinetischen Virus- und Antikörperwirkungen an der Erythrozytenmembran

In Medien wechselnder Wasserstoffionenkonzentration ändern sich die kataphoretischen Meßwerte oft in einer für bestimmte Oberflächen qualitativ und quantitativ charakteristischen Weise. (Es sei an die im Zusammenhang mit unseren Vorversuchen erwähnten Befunde von PIPER und RUHENSTROTH-BAUER (86) erinnert.) Wir verfolgten deshalb die Ausprägung der in den bisherigen Experimenten bei physiologischem Säuregrad des Reaktionsmilieus untersuchten Erscheinungen über die pH-Skala hinweg, indem wir native, ferner maximal K.P. virusabgesättigte sowie solche Hühnererythrozyten, die nacheinander mit höchsten K.P. Virus- und korrespondierenden Antikörperdosen vorbehandelt worden waren, in Proben einer Pufferserie (pH 3,95 bis pH 8,70) suspendierten und kataphoretisch prüften.

(Exp. XIX; Einzelheiten s. Protokoll Seite 90.)

Aus Fig. 16 ist ersichtlich, daß das elektrokinetische Potential der nativen wie der vorbehandelten Erythrozyten mit steigender H-Ionenkonzentration der Suspensionsflüssigkeit auf den Betrag: Null abfällt und bei fortgesetzter Säuerung des Mediums mit umgekehrtem (positivem) Vorzeichen wieder entsteht. Die ladungsausgleichenden Pufferlösungen differieren in ihrer pH-Wertigkeit (I.P.) beträchtlich. (Der I.P. liegt für normale Hühnererythrozyten bei pH 4,85, für den Zell-K.P. Virus-Komplex bei pH 5,2, und für den Zell-Virus-Antikörper-Verband bei pH 6,2). Nach dem offenbar jeweils charakteristischen

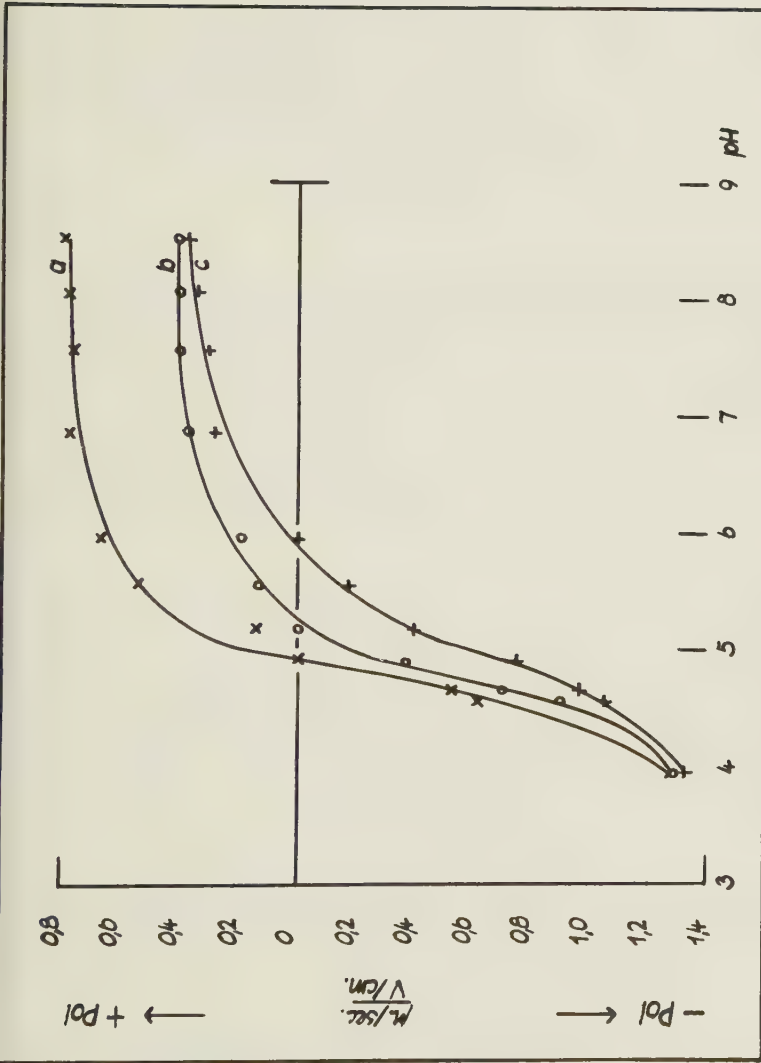


Fig 16: Die Abhängigkeit der elektrophoretischen Beweglichkeit nativer (a) und maximal K P virusbesetzter Hünnererythrozyten (b) sowie solcher Zell-Virus-Antikörper-Komplexe, an denen maximale Mengen von K. P. Virus und korrespondierenden Antikörper beteiligt sind (c) von der H-Ionenkonzentration des Milieus

Verlauf der Kurven in Fig. 16 zu urteilen, verändern sich die kennzeichnenden Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit der 3 Versuchssubjekte mit der H-Ionenkonzentration des Milieus und sind im Bereich zwischen pH 5 und pH 6 am größten. - In Medien stark saurer Reaktion suspendiert, weisen die 3 geprüften Präparate eine einseitliche elektrophoretische Beweglichkeit auf; vermutlich lösen sich unter diesen extremen Bedingungen Virus und spezifischer Antikörper wieder von der Zellmembran ab.

3. Zusammenfassung

Das (negative) elektrische Oberflächenpotential nativer Hühnererythrozyten, das mit Hilfe der kataphoretischen Methode gemessen werden kann, vermindert sich infolge der Rezeptordegradierenden Aktivität eines hinzugesetzten K P. Viruspräparats allmählich bis zu einem charakteristischen Endwert (um etwa die Hälfte), wobei - sofern aktives Virus angeboten worden ist - die Virusdosis ohne Bedeutung bleibt. Durch Vorbehandlung mit Perjodat läßt sich die natürlicherweise auf die Adsorption folgende Elution der Viruspartikel verhindern und der Erreger irreversibel an der Erythrozytenmembran fixieren.

Es zeigte sich, daß die Reduktion der elektrokinetischen Zell-Ladung auch bei Verwendung des inaktivierten Virus eintritt. Die Wirkung ist hier jedoch quantitativ von der zugeführten Virusmenge abhängig. - Schon der fünfzigste Teil einer agglutinierenden Einheit ist imstande, einen deutlichen kataphoretischen Effekt auszulösen; die maximale Einschränkung der elektrophoretischen Zellbeweglichkeit wird bei Zugabe von 4 bis 8 agglutinierenden Einheiten erreicht. Voll aktives und inaktives Virus vermögen die Erythrozytenmobilität etwa im gleichen Maße herabzusetzen.

Durch Perjodat wird das Zelloberflächenpotential erhöht. Deshalb ist bei der Beurteilung aller kataphoretischen Werte, welche bei der Arbeit mit "perjodiertem" Virus gewonnen worden sind, der ladungserhöhende "Perjodateffekt" in Rechnung zu stellen.

Die virusbesetzten Erythrozyten wurden in einem zweiten Schritt mit virus-spezifischem Antiserum behandelt, um zu untersuchen, ob eine von der vorgängigen Virusanheftung abhängige und somit virusspezifische kataphoretische Wirkung ausgelöst werden kann. Wir fanden, daß korrespondierende Antiseren das Potential der mit Virus belegten Zellen in spezifischer Weise reduzieren. (Kontrollimmunseren erwiesen sich als wirkungslos.) - Die Ausprägung die-

ses kataphoretischen Effektes entspricht der verwendeten Antikörperdosis. Eine halbe Hemmeinheit zeitigt dabei den geringsten meißbaren Effekt; die gegen irreversibel fixiertem Virus maximal wirksame Antikörpermenge ist 4 bis 8 mal größer als diejenige, die zur Neutralisation einer gleichen Dosis freier Virusteilchen notwendig ist.

Ein Heteroantikörper gegen Hühnererythrozyten sowie das Panagglutinin wurden kataphoretisch nachgewiesen und durch Adsorption an Zellen aus den Seren entfernt. - Die Ergebnisse ließen sich durch Kontrollversuche sichern.

Die kataphoretisch bestimmbarcn Virus- und Antikörperwirkungen auf die Erythrozytenmembran werden - jedenfalls in quantitativer Hinsicht - vom Säuregrad des Milieus beeinflußt.



ANHANG

G. VERSUCHSPROTOKOLLE

Exp. I (Seite 36):

Frische, d.s. während 1 bis 8 std. bei 4 ° C in Alseverlösung konservierte Hühnererythrozyten wurden 3mal in 0,85 %iger Kochsalzlösung gewaschen (Zentrif. 1 500 g; 3 min.) und in Pufferlösung zu einer Zelldichte von 0,5 % aufgeschwemmt. Diese Suspensionsflüssigkeit stellte ein Gemisch von MICHAELIS-Puffer und 5,4 %iger Glukoselösung im Verhältnis 1 : 3 dar (Ionenstärke 0,0375) und war als Serie von 11 Proben verschiedener H-Ionenkonzentration angelegt worden. Die Suspenderung erfolgte jeweils kurz (1 min.) vor Beschickung der Meßkammer. (Bei niedriger pH-Zahl des Mediums ist die Integrität der Zellen gefährdet, weshalb die Bestimmung der kataphoretischen Wanderungsgeschwindigkeit vor Eintritt der Haemolyse abgeschlossen sein muß. Hier kommt dem Untersucher die vergleichsweise große Stabilität des Hühnererythrozyten zugute.) - Es wurden in jeder der 11 Pufferproben 10 Einzelmessungen ausgeführt und der Durchschnittswert als für die betreffende H-Ionenkonzentration repräsentativ genommen.

Die Handhabung der Kataphoresekammer wurde im Kapitel über die Kataphorese ausführlich besprochen. - Die für alle Messungen gleichbleibenden Daten waren die folgenden:

Stromstärke: 2 mA; Meßstrecke: 2mal 30 μ ; Meßtiefe: 1. stationäre Ebene.

Ionenstärke des Standardpuffers: 0,0375

Die Meßzahlen der variablen Arbeitsdaten:

Temp. d. Puffers: 24,2 - 24,3 ° C;

Zimmertemp.: 25,2 - 25,4 ° C

Letztere gingen, entsprechend den im Kapitel über die Kataphorese aufgezeigten Gesichtspunkten, in die für eine Versuchstemperatur von 25,0 ° C errechnete Zellmobilität ein. (Die Beweglichkeit nimmt pro Grad Temperatursteigerung um etwa 4 % ihres für 0 ° C gültigen Wertes zu.)

Meßergebnisse:

Säuregrad der Pufferprobe: pH	3,94	4,57	4,64	4,90	5,17
Beweglichkeit d. Zellen in $\frac{\mu}{V \cdot \text{cm}}$	1,28	+ 0,62	+ 0,53	$\pm$ 0,00(IP)	0,12
	5,54	6,20	6,85	7,56	8,06
				8,70	
	-0,57	- 0,68	- 0,76	- 0,76	- 0,78
				- 0,79	

Exp. II (Seite 38):

Ausführung der Messungen wie unter Exp. I beschrieben;

Meßergebnisse:

Säuregrad der Pufferprobe: pH	3,11	3,77	4,08	4,33	4,58
Beweglichkeit d. Zellen in $\frac{\mu}{V \cdot \text{cm}}$	+1,52	+ 1,12	+ 0,76	+ 0,25	$\pm$ 0,00(IP)
	4,78	4,99	5,21	5,64	6,40
				7,26	7,72
	-0,55	- 0,91	- 1,12	- 1,29	- 1,30
				- 1,41	- 1,47

Anmerkung: Die Diskrepanz zwischen den Maßzahlen von PIPER und RUHENSTROTH-BAUER und den von uns ermittelten ist auf die unterschiedliche Zusammensetzung (Ionenstärke) der Suspensionslösung zurückzuführen; s. Kapitel über die Kataphorese.

Exp. III (Seite 38):

Das Vorgehen bei der Ausführung der HIRST-Tests entsprach den Vorschriften, wie sie im Kapitel: Material und Methoden angegeben wurden.

Titer:

s. Text.

Exp. IV (Seite 39):

Das Vorgehen bei der Ausführung der HIRST- und Hemmungstests sowie bei der Perjodatinaktivierung der Virussuspension entsprach den Vorschriften, wie sie im Kapitel: Material und Methoden angegeben wurden.

Titer:

ursprüngliche K.P. virushaltige Chorio-Allantoisflüssigkeit:

1 : 1 024; perjodatinaktiviertes K.P.Viruspräparat: 1 : 128;

Antiserum: jeweils 1 : 1 048

Exp. V (Seite 40):

Suspensionsflüssigkeiten:

A	Mischungsverhältnis von MICHAELIS	1 : 0	Ionenstärke	0,150
B	puffer-(pH 6,5) und 5,4 %iger	1 : 1		0,075
C	Glucoselösung	1 : 5		0,025
D		1 : 10		0,014
E		1 : 20		0,007
F		0 : 1		0,000

Das Vorgehen bei der Ausführung der HIRST-Tests sowie bei der Perjodat-inaktivierung der Virussuspension entsprach den Vorschriften, wie sie im Kapitel: Material und Methoden angegeben wurden.

Titer:

Reihe:	Viruspräparat:	Ionenstärke:	pH-Wert:	Titer:
Ax	(i) (inaktiviert)	0,150	8,16	1 : 1 ²¹
Ax	(a) (voll aktiv)	0,150	8,16	1 : 2 ²⁸
Ay	(i)	0,150	6,02	1 : 2 ¹¹
Ay	(a)	0,150	6,02	1 : 2 ¹⁴
Az	(i)	0,150	3,68	1 : 2 ⁴
Az	(a)	0,150	3,68	1 : 2 ⁵
Bx	(i)	0,075	7,98	1 : 2 ¹⁴
Bx	(a)	0,075	7,98	1 : 2 ¹⁹
By	(i)	0,075	6,03	1 : 2 ⁸
By	(a)	0,075	6,03	1 : 2 ¹⁰
Bz	(i)	0,075	3,72	1 : 2 ³
Bz	(a)	0,075	3,72	1 : 2 ⁴
Cx	(i)	0,025	7,79	1 : 2 ⁷
Cx	(a)	0,025	7,79	1 : 2 ¹¹
Cy	(i)	0,025	6,03	1 : 2 ⁵
Cy	(a)	0,025	6,03	1 : 2 ⁶
Cz	(i)	0,025	3,77	1 : 2 ³
Cz	(a)	0,025	3,77	1 : 2 ³

Reihe:	Viruspräparat:	Ionenstärke:	pH-Wert:	Titer
Ex	(i)	0,007	7,11	1 : 2 ⁴
Ex	(a)	0,007	7,11	1 : 2 ⁵
Ey	(i)	0,007	6,03	1 : 2 ³
Ey	(a)	0,007	6,03	1 : 2 ⁴
Ez	(i)	0,007	3,83	1 : 2 ³
Ez	(a)	0,007	3,83	1 : 2 ³

Exp. VII (Seite 46):

Reagenzglas Nr. 1 wurde mit K.P.virushaltiger, dialysierter Chorio-Allantoisflüssigkeit (gen. "Präparat P"; Haemagglutinationstiter 1 : 64) und $\frac{m}{100}$ Natriumperjodatlösung zu gleichen Teilen beschickt,

ebenso Reagenzglas Nr. 2.

Reagenzglas Nr. 3 enthielt n ml einer $\frac{m}{100}$ Natriumperjodatlösung und 2n ml einer 5,4 %igen Glucoselösung.

In Reagenzglas Nr. 4 wurden gleiche Volumina des "Präparats P" und einer 2 %igen Hühnererythrozytenaufschwemmung (in 0,85 %iger Kochsalzlösung, 3mal gewaschen) zusammengegossen. -

60 min. nach Durchmischung der in Reagenzglas Nr. 2 geführten Ingredienzien wurden 2 Teile einer physiologischen Glucoselösung zugegeben;

für Reagenzglas Nr. 1 galt dasselbe, jedoch wurde weitere 10 min. später 1 Teil einer 2 %igen Hühnererythrozytensuspension eingebracht.

2 min. nach Bereitung des Inhalts von Reagenzglas Nr. 3 wurden diesem n ml des "Präparats P" zugefügt, weitere 60 min. später n ml einer 2 %igen Hühnererythrozytensuspension zugesetzt. -

Um einen unmittelbaren Vergleich der Ergebnisse zu gewährleisten, war der Zeitplan für die Manipulationen und Wartezeiten so angelegt, daß aktives (in Reagenzglas Nr. 4) und inaktives K.P.Virus (in Reagenzglas Nr. 1) zur gleichen Zeit mit Hühnererythrozyten in Kontakt trat. Die Vorschriften, die sich auf den Inhalt der Reagenzgläser Nr. 2 und Nr. 3 bezogen, waren ihrerseits ebenfalls gleichzeitig erfüllt. Über die synchrone Auswertung der Reaktionen s.u. -

Nach Verlauf von 60 min. wurde das Gemisch aus Reagenzglas Nr. 1 während 5 min. bei 1 500 g zentrifugiert und der Überstand nach HIRST ausgetestet ("H-Test 1A"). Dies wiederholte sich für die immer wieder in 2 oder 4 Tei-

len einer 0,85 %igen Kochsalzlösung suspendierten roten Blutzellen zunächst 3 weitere Male; dabei wurde das Sediment in möglichst "trockenem" Zustande in das frische Medium überführt ("H-Tests 1B, 1C, 1D"). - Nach der letzten Waschung und Aufwirbelung der Erythrozyten in 1 Teil einer 0,85 %igen Kochsalzlösung blieben diese während 60 min. bei Zimmertemperatur stehen. Dann wurden die roten Blutzellen in der Zentrifuge abgeschieden (1 500 g; 5 min.) und der Überstand im Haemagglutinationstest ("H-Test 1E") geprüft. - Das Zellsediment, erneut in 1 Teil einer frischen 0,85 %igen Kochsalzlösung verteilt, wurde nach weiteren 60 min. wiederum in der Zentrifuge abgeschieden (1 500 g; 5 min.) und der Überstand dem HIRST-Test unterworfen ("H-Test 1F").

Das im Reagenzglas Nr. 4 befindliche Zellagglutinat wurde in der Zentrifuge von seinem Medium abgetrennt und der Überstand gleichzeitig mit der Flüssigkeit aus Reagenzglas Nr. 2 ("H-Test 2") und dem Überstand aus Reagenzglas Nr. 3 ("H-Test 3") als "H-Test 4" im Haemagglutinationstest untersucht. Die Ablesung der (gleichzeitig angesetzten) routinemäßigen HIRST-Proben ergab die folgenden

Titer:

"H-Test P"	(Stammpräparat: dialysierte, nicht "perjodierte" K.P.virushaltige Chorio-Allantoisflüssigkeit	1 : 64
"H-Test 1A"	(Überstand eines durch inaktiviertes K.P.Virus bedingten Hühnererythrozytenagglutinats)	Ø
"H-Test 1B"	(dto. (2. Waschung))	Ø
"H-Test 1C"	(dto. (3. Waschung))	Ø
"H-Test 1D"	(dto. (4. Waschung))	Ø
"H-Test 1E"	(dto. (5. Waschung))	Ø
"H-Test 1F"	(dto. (6. Waschung))	Ø
"H-Test 2"	(perjodatbehandeltes K.P.Virusstammpräparat "P")	1 : 8
"H-Test 3"	(Stammpräparat, das mit glukoseneutralisierte Natriumperjodatlösung versetzt und später in Kontakt mit Hühnererythrozyten gebracht worden war (Überstand)	1 : 4
"H-Test 4"	(Überstand eines durch aktives K.P.Virus bedingten Hühnererythrozytenagglutinats)	1 : 16

Anmerkung: um aus diesen Endpunktbestimmungen gültige Schlüsse ziehen zu können, muß man den durch Zusatz der verschiedenen Ingredientien erreichten Verdünnungsgrad der geprüften Flüssigkeiten in Rechnung stellen.

Exp. VIII (Seite 47):

Um inaktive K.P. Virussuspensionen von 8 aggl. Einh. (I1) und $\frac{1}{8}$ aggl. Einh. (I2) zu erhalten, wurde eine "perjodierte" K.P. virushaltige Chorio-Allantoisflüssigkeit (Haemagglutinationstiter 1 : 128) in Standardpuffer verdünnt. - Ebenso wurde verfahren, um aus einer voll aktiven K.P. virushaltigen Chorio-Allantoisflüssigkeit Viruspräparate von 8 aggl. Einh. (A1), $\frac{1}{8}$ aggl. Einh. (A2) und $\frac{1}{8}$ aggl. Einh. (A3) herzustellen. 512

Ferner waren 5 Proben einer Hühnererythrozytenaufschwemmung zur Hand. Die frischen, 3mal in Standardpuffer gewaschenen und berteilten Zellen standen gebrauchsfertig in einer Dichte von 0,5 %.

Die Kataphoreseapparatur mußte so vorbereitet sein, daß $\frac{1}{2}$ min. nach Füllung der Kammer mit dem Untersuchungsgut die erste routinemäßige Zeitmessung erfolgen konnte. - Weil der Cuvetteninhalt über eine Zeitspanne von 90 min. hin beobachtet werden sollte, war es notwendig, daß die Glaszelle sich leicht in der Ebene des Mikroskoptisches um 180 °, d.h. um eine horizontale Achse - schwenken ließ. (Nach etwa 30 min. hatten sich die Erythrozyten durch Sedimentation aus dem Gesichtsfeld entfernt.)

Wir gaben jeweils eine der Virussuspensionen (I1, I2, A1, A2, A3) mit einer 0,5 %igen Zellaufschwemmung im Verhältnis 1 : 1 (8 ml) zusammen, schüttelten das Gemisch kurzfristig und kräftig und brachten es dann unverzüglich in die Meßkammer ein. Die erste Geschwindigkeitsbestimmung konnte $\frac{1}{2}$ min. nach der sog. "Zeit O" (Augenblick, in dem die beiden Flüssigkeiten zusammengegossen worden waren) vorgenommen werden. In den min. 1 bis 10 nach "Zeit O" erfolgten die kataphoretischen Messungen in Abständen von $\frac{1}{2}$ min., später (min. 10 bis 40 nach "Zeit O") nach Minutenintervallen und zwischen der 40. und 90. min. nach "Zeit O" alle 5 min.

Die für die Einzelmessungen gleichbleibenden Daten sind im Protokoll bei Exp. I aufgeführt. Variable Arbeitsdaten:

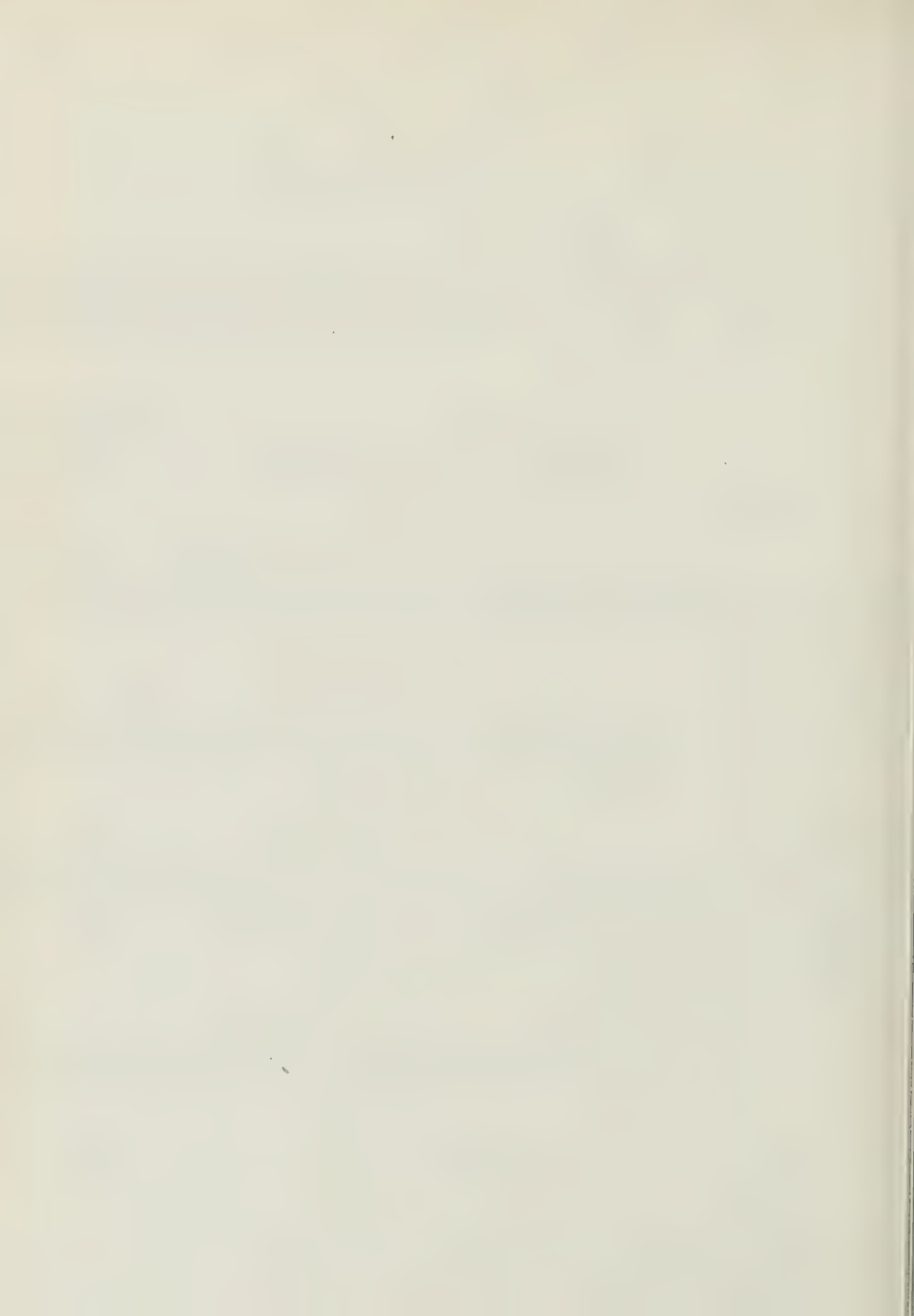
Temp. d. Puffers: 23,7 - 23,9 ° C;
Zimmertemp.: 24,5 - 24,7 ° C.

Meßergebnisse:

min. nach "Zeit O"

Viruspräparat

	A1	A2	A3	I1	I2
0,5	0,640	0,722	0,712	-	-
1	0,458	0,656	0,712	0,570	0,663
1,5	0,495	0,613	0,688	0,518	0,712
2	0,453	0,600	0,695	0,480	0,688
2,5	0,449	0,600	0,688	0,464	0,688
3	0,413	0,588	0,640	0,456	0,663
3,5	0,403	0,528	0,655	0,419	0,620
4	0,402	0,523	0,613	0,438	0,640
4,5	0,386	0,500	0,600	0,425	0,633
5	0,380	0,495	0,594	0,405	0,627
5,5	0,368	0,510	0,600	0,425	0,633
6	0,365	0,495	0,576	0,460	0,627
6,5	0,358	0,475	0,518	0,442	0,648
7	0,363	0,482	0,438	0,655	0,655
7,5	0,372	0,475	0,554	0,438	0,633
8	0,370	0,452	0,566	0,427	0,627
8,5	0,354	0,460	0,550	0,416	0,577
9	0,360	0,438	0,518	0,438	0,606
9,5	0,358	0,438	0,542	0,437	0,740
10	0,357	0,438	0,495	0,416	0,620
11	0,352	0,419	0,472	0,452	0,633
12	0,357	0,433	0,523	0,435	0,600
13	0,346	0,412	0,482	0,419	0,613
14	0,363	0,410	0,456	0,442	0,613



Exp. IX (Seite 51):

Die Virussuspensionen (2 Serien):

Nr.	aggl. Einh.	Nr.	aggl. Einh.
1	128	9	$\frac{1}{2}$
2	64	10	$\frac{1}{4}$
3	32	11	$\frac{1}{8}$
4	16	12	$\frac{1}{16}$
5	8	13	$\frac{1}{32}$
6	4	14	$\frac{1}{64}$
7	2	15	$\frac{1}{128}$
8	1	16	$\frac{1}{256}$

Die für die kataphoretischen Einzelmessungen gleichbleibenden Daten sind im Protokoll bei Exp. I aufgeführt. Variable Arbeitsdaten:

Temp. d. Puffers: 24,2 - 24,3 °C;

Zimmertemp.: 24,4 - 24,6 °C.

Meßergebnisse:

Viruspräparat Nr. (1. Serie)

1	0,433	9	0,518
2	0,426	10	0,570
3	0,419	11	0,623
4	0,380	12	0,654
5	0,365	13	0,712
6	0,386	14	0,720
7	0,438	15	0,775
8	0,485	16	0,760
Kontr.	0,760		$\frac{\mu/\text{sec.}}{\text{Volt/cm}}$

Titer:

Viruspräparat Nr. (2. Serie)

	Überstand: Haemagglutinationstit. nach Reaktion d. Virus mit 0,5 %iger Erythrozy- suspension.	Titer korrigiert für eine Zelldichte von 0,25 % (s. u.)
1	1 : 16	1 : 32
3	1 : 4	1 : 8
5	1 : 2	1 : 4
7	1 : 1	1 : 2
9	Ø	Ø
11	Ø	Ø
13	Ø	Ø
15	Ø	Ø

Anmerkung: In diesem wie in allen folgenden der kataphoretischen Bestimmung von Zell-Virus-(Antikörper-)Komplexen dienenden Versuchen wurden die K. P. Virus-(Antikörper-)präparate jeweils einer 0,5 %igen Hühnererythrozytensuspension zu gleichen Teilen zugemischt. Dies ist bei der Beurteilung der wirksamen Dosen zu berücksichtigen. Bezieht man die agglutinierende (und damit die hemmende) Einheit auf das virus-(antikörper-)behandelte Meßgut, so muß die in den zugeführten Präparaten enthaltene, gegen eine 0,25 %ige Zellaufschwemmung getestete (HIRST-Probe) Zahl der Viruseinheiten (und Antikörpereinheiten) verdoppelt werden. - Die im Text vorgewiesenen Diagramme sind in diesem Sinne korrigiert; im Protokoll erscheinen die Meßergebnisse bei der aktuellen Konzentration des verwendeten Materials.

Exp. X (Seite 56):

1. Lösung: 1 Teil einer 0,85 %igen Kochsalzlösung wurde mit 1 Teil einer $\frac{m}{100}$ Natriumperjodatlösung sowie 2 Teilen einer 5,4 %igen Glukoselösung vermischt.

2. Lösung: 3 Teile einer 0,85 %igen Kochsalzlösung wurden mit 1 Teil einer $\frac{m}{100}$ Natriumperjodatlösung zusammengegeben. Die kataphoretischen Messungen wurden wie beim Exp. IX ausgeführt; auch die variablen Arbeitsdaten s.d.

Meßergebnisse:

<u>Präparat Nr.</u>	<u>1. Lösung</u>	<u>2. Lösung</u>
1	1,035	1,035
2	0,890	1,000
3	0,838	0,934
4	0,787	0,905
5	0,755	0,845
6	0,760	0,814
7	0,765	0,796
8	0,760	0,775
9	0,755	0,765
10	0,760	0,760
		<u>μ sec.</u>
		Volt/cm

Exp. XI (Seite 56):

Es wurde 1 ml Formaldehyd 33 % (1. Messung) und 0,1 ml Ameisensäure 300,0 (2. Messung) mit 1 ml einer 0,5 %igen Hühnererythrozytensuspension (Medium: 0,85 %ige Kochsalzlösung) vermischt. Vor Einbringung in die Kathaphoresekammer blieben die Aufschwemmungen während 5 min. bei Zimmertemperatur stehen, um dann 1mal in Standardpuffer gewaschen zu werden.

Meßergebnisse:

1. Probe	1,480
2. Probe	2,850
	<u>μ sec.</u>
	Volt/cm

Exp. XII (Seite 57):

Die Virussuspensionen:

<u>Nr.</u>	<u>aggl. Einh.</u>	<u>Nr.</u>	<u>aggl. Einh.</u>	<u>Nr.</u>	<u>aggl. Einh.</u>
1	64	6	2	11	$\frac{1}{16}$
2	32	7	1	12	$\frac{1}{32}$
3	16	8	$\frac{1}{2}$	13	$\frac{1}{64}$
4	8	9	$\frac{1}{4}$	14	$\frac{1}{128}$
5	4	10	$\frac{1}{8}$	15	$\frac{1}{256}$

(Ursprüngliche K.P.virus-haltige Chorio-Allantoisflüssigkeit: 128 aggl. Einheiten.)

1 Teil einer Hühnererythrozytensuspension (Medium: 0,85 %iger Kocisalz-lösung) wurde mit 1 Teil einer Flüssigkeit versetzt, die zu 20 % aus $\frac{m}{20}$ Perjodat und zu 80 % aus 0,85 %iger Kocisalzlösung bestand. Die Aufschwemmung blieb während 10 min. bei Zimmertemperatur stehen, nach welcher Frist 1 Teil einer 0,85 %igen Glukoselösung eingebracht wurde. Anschließend erfolgte Abscheidung und 1maliges Waschen der Zellen in der Zentrifuge (1 500 g) sowie Aufwirbelung in Standardpuffer zu einer Dichte von 0,5 %. Diese "perjodierte" Hühnererythrozytensuspension ver-mischten wir jeweils mit einer der bereitgestellten Virusdilutionen (voll aktiv; s.o.), warteten 5 min. lang ab und gaben die Suspension in die Zentrifuge. Nach Abschleudern und 1maligem Waschen (1 500 g) sowie Aufschwemmen der roten Blutkörperchen in Standardpuffer (0,5 %) wurde das Untersuchungsgut in die Kataphoresekammer gefüllt und ausgewertet. Wir führten, wie üblich, an jeder Probe 10 Einzelmessungen aus und nah-men deren Durchschnittswert als für die in Betracht stehende Suspension kennzeichnend.

Die für die einzelnen Bestimmungen gleichbleibenden Daten sind im Proto-koll beim Exp. I aufgeführt. Variable Arbeitsdaten:

Temp. d. Puffer: 23,2 - 23,3 ° C;
Zimmertem.: 23,4 - 23,6 ° C.

Meßergebnisse:

Viruspräparat Nr. (in Standardpuffer verdünnt)

1	0,507	9	0,688
2	0,516	10	0,750
3	0,503	11	0,825
4	0,514	12	0,860
5	0,540	13	0,920
6	0,562	14	0,954
7	0,580	15	0,925
8	0,607		$\frac{\mu}{\text{sec.}}$ Volt/cm

Exp. XIV (Seite 62):

Proben einer 1 %igen Hühnererythrozytensuspension (Medium: 0,85 %ige Kochsalzlösung) und eines (in 0,85 %iger Kochsalzlösung) auf 4 agglutinierende Einheiten verdünnten "perjodierten" K.P. Viruspräparats wurden zu gleichen Teilen vermischt, während 10 min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen und dann mit Antiserumverdünnungen (Dilutionsflüssigkeit: 0,85 %ige Kochsalzlösung), die 1 (A), 4 (B), 8 (C) oder 16 (D) hemmende Antikörpereinheiten enthielten, zusammengegeben. Nach weiteren 10 min. erfolgte Abscheiderung der roten Blutkörperchen in der Zentrifuge (1 500 g) und Prüfung der Überstände A, B, C, D im routinemäßigen Hemmungstest (s. Kapitel: Material und Methoden; Virustestdosis: 1 agglutinierende Virus-einheit).

Titer:

A : 0; B : 0; C : 4 hemmende Einh.; D : 8 (16) hemmende Einh.
(Die zur Kontrolle auf freies Virus ausgeführten HIRST-Tests der nämlichen Flüssigkeiten fielen durchweg negativ aus.)

Exp. XV (Seite 62):

Um eine Hitzekoagulation zu vermeiden, wurden die im Text genannten Seren vor ihrer Inaktivierung (30 min. bei 62,5 ° C) mit 0,85 %iger Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 1 verdünnt; der Hemmtiter des Antiserums war nach der Hitzebehandlung von 1 : 1 024 auf 1 : 128 gefallen.

1. In jeweils 30 Teilen der solchermaßen vorbehandelten Serumproben wurde 1 Teil eines kompakten Hühnererythrozytensediments aufgewirbelt und die Suspension 30 min. lang bei Zimmertemperatur gehalten. Nach Abscheidung in der Zentrifuge (1 500 g; 128 hemmende Einheiten im Überstand) wurde das Serum für Versuch Nr. 3 bereitgestellt und die Erythrozyten nach 3maligen Waschen in 0,85 %iger Kochsalzlösung und Standardpuffer in der Kataphorese-Kammer geprüft.

Die für die Einzelmessungen gleichbleibenden Daten sind im Protokoll bei Exp. I aufgeführt. Variable Arbeitsdaten:

Temp. d. Puffers: 23,8 ° C;

Zimmertemp.: 23,9 ° C.

Ergebnis:

Die Meßwerte lagen durchweg bei 0,530 $\frac{\mu}{\text{sec.}}$ Volt/cm, jene der Kontrollen bei 0,76 $\frac{\mu}{\text{sec.}}$ Volt/cm.

2. Eine 2 %ige Hunererythrozytensuspension wurde mit voll K.P. virus-aktiver, dialysierter Chorio-Allantoisflüssigkeit (Haemagglutinationstiter: 1 : 128) im Verhaltis 30 : 1 gemischt und für die Dauer von 2 std. im Brutschrank (38,5 ° C) stehen gelassen. Danach zentrifugierten wir die Zellen ab (Haemagglutinationstiter des Überstands: 1 : 4 (Verdünnung durch das Erythrozytenmedium)), wuschen sie 2mal in großen Volumina einer 0,85 %igen Kochsalzlösung (Zelldichte dabei etwa 0,1 %) und bestimmten nach der Standardmethode ihre elektrophoretische Beweglichkeit. (Der größere Teil des virusvorbehandelten Erythrozytenmaterials wurde zurück-behalten; s.u.)

Die für die Einzelmessungen gleichbleibenden Daten sind im Protokoll bei Exp. I aufgeführt. Variable Arbeitsdaten:

Temp. d. Puffers: 23,8 ° C;
Zimmertemp.: 23,9 ° C.

Ergebnis:

Es wurde ein Durchschnittswert von 0,374 $\frac{\mu}{\text{sec.}} \frac{\text{Volt}}{\text{cm}}$ gemessen.

3. Den erythrozytenvorbehandelten Seren (s. 1.) wurden nun "trockene" virusvorbehandelte rote Blutkörperchen (s.2.) im Verhaltis 20 : 1 zugefügt. Die so bereitete Suspension blieb während 30 min. bei Zimmertemperatur stehen. Nach Sedimentation (Hemmungstiter des Überstands: 1 : 128; die unter 2. gewonnenen Erythrozyten waren demnach frei von Virus gewesen) und 3 maliger Waschung wurden die Zellen nach dem üblichen Verfahren kataphoretisch geprüft.

Die für die Einzelmessungen gleichbleibenden Daten sind im Protokoll bei Exp. I aufgeführt. Variable Arbeitsdaten:

Temp. d. Puffers: 23,8 ° C;
Zimmertemp.: 23,9 ° C.

Ergebnis:

Die elektrophoretische Zellmobilität betrug durchschnittlich 0,344 $\frac{\mu}{\text{sec.}} \frac{\text{Volt}}{\text{cm}}$.

4. Virusvorbehandelte (s.2.) und native Hunererythrozyten wurden je zu einer Dichte von 0,5 % in 0,85 %iger Kochsalzlösung aufgewirbelt und mit dem Antiserum zusammengegeben, das zuvor sowohl mit frischen als auch mit virusvorbehandelten roten Blutkörperchen (s.2.) in Kontakt gestanden hatte. Nach 10 min. erfolgte Waschung (3mal) und kataphoretische Untersuchung des Zellgutes.

Die für die Einzelmessungen gleichbleibenden Daten sind im Protokoll bei Exp. I aufgeführt. Variable Arbeitsdaten:

Temp. d. Puffers: 23,8 ° C;
Zimmertemp.: 23,9 ° C.

Ergebnis:

Native serumbehandelte Erythrozyten: 0,760 $\frac{\mu\text{sec.}}{\text{Volt/cm}}$

virus- und serumbehandelte Erythrozyten (s. 2.) 0,370 $\frac{\mu\text{sec.}}{\text{Volt/cm}}$

Exp. XVI (Seite 63):

Eine perjodatinaktivierte, K.P.virushaltige Chorio-Allantoisflüssigkeit (Haemagglutinationstiter: 1 : 64) wurde in Standardpuffer verdünnt, so daß die folgenden 3 Virussuspensionen zur Verfügung standen:

- A : 16 agglutinierende Einheiten;
B : 2 agglutinierende Einheiten sowie
C : $\frac{1}{2}$ agglutinierende Einheit.

Vorbehandeltes, d.h. hitzeinaktiviertes und doppelt adsorbiertes K.P.virus-spezifisches Antiserum vom Kaninchen (Hemmtiter: 1 : 128) dilutierten wir halbbschlächting in Standardpuffer, so daß 16 antikörperhaltige Lösungen (128 bis $\frac{1}{256}$ hemmende Einheiten) vorlagen.

Die Virussuspensionen A, B und C wurden jeweils auf 16 Röhrchen verteilt (A_{1-16} ; B_{1-16} ; C_{1-16}) und alle Einzelproben zu gleichen Teilen mit je einer 0,5 %igen Hühnererythrozytensuspension (Medium: Standardpuffer) vermischt. Nach 10 min. zentrifugierten wir die Zellaufschwemmungen (1 500 g) und gaben zu den "trockenen" Sedimenten (nach Absaugen des Überstandes) je eine Serumverdünnung.

Es wurde 10 min. lang bei Zimmertemperatur abgewartet, dann zentrifugiert und anschließend das Untersuchungsgut in der Kataphorese-Kammer gemessen. Die Apparatur wurde routinemäßig gehandhabt.

Die für die Einzelmessungen gleichbleibenden Daten sind im Protokoll bei Exp. I aufgeführt. Variable Arbeitsdaten:

Temp. d. Puffers: 23,8 - 24,0 ° C;
Zimmertemp.: 25,0 - 25,2 ° C.

Meßergebnisse:

Probe	A(16 E.)	B(2 E.)	C($\frac{1}{2}$ E.) Virus
128	0,316	0,369	0,465
64	0,315	0,380	0,463
32	0,315	0,378	0,465
16	0,320	0,376	0,463
8	0,338	0,380	0,465
4	0,357	0,356	0,475
2	0,367	0,415	0,465
1	0,376	0,430	0,475
$\frac{1}{2}$	0,383	0,438	0,495
$\frac{1}{4}$	0,396	0,456	0,503
$\frac{1}{8}$	0,400	0,456	0,535
$\frac{1}{16}$	0,399	0,456	0,530
$\frac{1}{32}$	0,400	0,456	0,535
$\frac{1}{64}$	0,400	0,459	0,541
$\frac{1}{128}$	0,400	0,456	0,535
$\frac{1}{256}$	0,400	0,456	0,535

Antikörpereinheiten

$\frac{\mu/\text{sec.}}{\text{Volt/cm}}$

Exp. XVII (Seite 65):

Vorbehandeltes, d. n. hitzeinaktiviertes und doppelt adsorbiertes K.P.virus-spezifische Antiserum vom Kaninchen (Hemmtiter: 1 : 128) wurde in Standardpuffer verdünnt, so daß die folgenden beiden antikörperhaltigen Lösungen zur Verfügung standen:

A : 32 hemmende Einheiten;

B : 4 hemmende Einheiten.

Eine peroxidinaktivierte, K.P.virushaltige Chorio-Allantoisflüssigkeit (Haemagglutinationstiter: 1 : 64) diluieren wir halb-schlächting in Standardpuffer, so daß die folgenden Virussuspensionen vorlagen:

a : 32 aggl. Einh.

b : 16

c : 8

d : 4

e : 2

f : 1

g : $\frac{1}{2}$

h : $\frac{1}{4}$

i : $\frac{1}{8}$

k : $\frac{1}{16}$

l : $\frac{1}{32}$

m : $\frac{1}{64}$

n : $\frac{1}{128}$

o : $\frac{1}{256}$

p : $\frac{1}{512}$

Die Virussuspensionen a bis p wurden jeweils auf 3 Röhrchen verteilt (a_{1-3} ; b_{1-3} ; usw.) und alle Einzelproben zu gleichen Teilen mit einer 0,5 %igen Hühnerythrozytensuspension (Medium: Standardpuffer) vermicht. Nach 10 min. zentrifugierten wir die Zellaufschwemmungen und gaben zu den "trockenen" Sedimenten der Nr. 1(a-p) 1 Teil des Präparats A, der Nr. 2(a-p) 1 Teil des Präparats B. (Zelldichte: 0,5 %).

Es wurde 10 min. lang bei Zimmertemperatur abgewartet, dann zentrifugiert und anschließend das Untersuchungsgut in der Kataphorese-Kammer gemessen. Die Apparatur wurde routinemäßig gehandhabt. (Wie schon im letzten Experiment, gingen wir, um die Übereinstimmung der Wartefristen bei der Erledigung der einzelnen Ansätze zu gewährleisten, nach einem genauen Zeitplan vor.)

Die für die Einzelmessungen gleichbleibenden Daten sind im Protokoll bei Exp. I aufgeführt. Variable Arbeitsdaten:

Temp. d. Puffers: 23,9 ° C;

Zimmertemp.: 25,0 ° C.

Meßergebnisse:

<u>Probe</u>	<u>32 E.</u>	<u>4 E.</u>	<u>Antikörper</u>
32 Aa	0,353	Ba	0,380
16 Ab	0,345	Bb	0,375
8 Ac	0,345	Bc	0,375
4 Ad	0,358	Bd	0,413
2 Ae	0,417	Be	0,425
1 Af	0,475	Bf	0,477
$\frac{1}{2}$ Ag	0,523	Bg	0,543
E. Virus			

<u>Probe</u>	<u>32' E.</u>	<u>4 E.</u>	<u>Antikörper</u>
$\frac{1}{4}$ Ah	0,582	Bh	0,591
$\frac{1}{8}$ Ai	0,627	Bi	0,670
$\frac{1}{16}$ Ak	0,722	Bk	0,740
$\frac{1}{32}$ Al	0,712	Bl	0,736
$\frac{1}{64}$ Am	0,732	Bm	0,758
$\frac{1}{128}$ An	0,745	Bn	0,758
$\frac{1}{256}$ Ao	0,760	Bo	0,762
$\frac{1}{512}$ Ap	0,760	Bp	0,760
E. Virus		$\frac{\mu/\text{sec.}}{\text{Volt/cm}}$	

Exp. XVIII (Seite 67):

1. Native Hühnererythrozyten wurden routinemäßig in der Kataphorese-Kammer untersucht. Die für diese und die folgenden Messungen gleichbleibenden Daten sind im Protokoll bei Exp. I aufgeführt. Variable Arbeitsdaten:

Temp. d. Puffers: 23,5 - 24,0 °C;

Zimmertemp.: 24,8 - 25,0 °C.

Ergebnis: 0,765 $\frac{\mu/\text{sec.}}{\text{Volt/cm.}}$

2. $\frac{m}{100}$ Natriumperjodat wurde mit Standardpuffer und 0,85 %iger Glukose-lösung im Verhältnis 1 : 1 : 2 vermischt, anschließend diese Flüssigkeit mit 0,5 %iger Hühnererythrozytensuspension zu gleichen Teilen versetzt. Nach 3 min. erfolgte Abscheidung und Prüfung des Zellguts auf seine elektro-phoretische Beweglichkeit hin. Z. Ausführung s. 1.

Ergebnis: 1,000 $\frac{\mu/\text{sec.}}{\text{Volt/cm.}}$

3. Eine 0,5 %ige Aufschwemmung roter Hühnerblutzellen wurde mit erregere-freier Chorio-Allantoisflüssigkeit (s. Kapitel: Material und Methoden) zu gleichen Teilen zusammengegeben und während 5 min. stehen gelassen. Na Nach Abtrennung der Erythrozyten wurden diese kataphoretisch bestimmt, Z. Ausführung s. 1.

Ergebnis: 0,770 $\frac{\mu/\text{sec.}}{\text{Volt/cm.}}$

4. Nicht infektiöse Eiflüssigkeit wurde routinemäßig "perjodiert" und mit 0,5 %iger Hühnererythrozytensuspension im Verhältnis 1 : 1 vermischt. Nach 5 min. erfolgte Sedimentation und kataphoretische Untersuchung der Zellen. Z. Ausführung s. 1.

Ergebnis: 1,000 $\frac{\mu/\text{sec.}}{\text{Volt/cm}}$.

5. Ein 4 agglutinierende Einheiten enthaltendes und nach der Perjodatinaktivierung nicht verdünntes K.P.Viruspräparat wurde zu gleichen Teilen mit einer 0,5 %igen Hühnererythrozytensuspension versetzt. Nach 5 min. wurden die roten Blutkörperchen abgeschieden und in der Kataphorese-Kammer geprüft. Z. Ausführung s. 1.

Ergebnis: 0,435 $\frac{\mu/\text{sec.}}{\text{Volt/cm}}$.

6. Nicht vorbehandeltes Kontrollimmunserum vom Kaninchen wurde mit einer Hühnererythrozytensuspension im Verhältnis 1 : 1 zusammengegeben. Nach 5 min. erfolgte Abtrennung und kataphoretische Untersuchung der Zellen. Z. Ausführung s. 1.

Ergebnis: 0,551 $\frac{\mu/\text{sec.}}{\text{Volt/cm}}$.

7. Vorgehen wie bei 6., jedoch unter Verwendung inaktivierten und doppelt adsorbierten Kontrollimmunserums.

Ergebnis: 0,765 $\frac{\mu/\text{sec.}}{\text{Volt/cm}}$.

8. Vorgehen wie bei 6., jedoch unter Verwendung nicht vorbehandelten Antiserums.

Ergebnis: 0,556 $\frac{\mu/\text{sec.}}{\text{Volt/cm}}$.

9. Vorgehen wie bei 6., jedoch unter Verwendung inaktivierten und doppelt adsorbierten Kontrollimmunserums.

Ergebnis: 0,765 $\frac{\mu/\text{sec.}}{\text{Volt/cm}}$.

10. Ein 4 agglutinierende Einheiten enthaltendes und nach der Perjodatinaktivierung nicht verdünntes K.P.Viruspräparat wurde zu gleichen Teilen mit einer 0,5 %igen Hühnererythrozytensuspension versetzt. Nach 5 min. wurden die Zellen abzentrifugiert und in inaktiviertem und doppelt adsorbiertem (Kaninchen-)Kontrollimmunserum, 1 Teil, aufgeschwemmt. Nach

weiteren 5 min. erfolgte Abtrennung und kataphoretische Untersuchung der roten Blutkörperchen. Z. Ausführung s. 1.

Ergebnis: $0,447 \frac{\mu/\text{sec.}}{\text{Volt/cm}}$.

11. Vorgehen wie bei 10, jedoch unter Verwendung inaktivierten und doppelt adsorbierten Antiserums.

Ergebnis: $0,362 \frac{\mu/\text{sec.}}{\text{Volt/cm}}$.

12. Vorgehen wie bei 10, jedoch unter Vorbehandlung der Erythrozyten mit "perjodierter", unverdünnter nicht infektiöser Chorio-Allantoisflüssigkeit.

Ergebnis: $1,000 \frac{\mu/\text{sec.}}{\text{Volt/cm}}$.

13. Native Hühnererythrozyten wurden routinemäßig in der Kataphorese-Kammer untersucht. Z. Ausführung s. 1.

Ergebnis: $0,765 \frac{\mu/\text{sec.}}{\text{Volt/cm}}$.

(Suspensionsmedium: durchweg Standardpuffer)

Exp. XIX (Seite 68):

Ein perjodatinaktiviertes K.P.Viruspräparat wurde in der für die betreffende kataphoretische Messung als Medium vorgesehenen Pufferlösung auf eine haemagglutinierende Aktivität von 16 Einheiten verdünnt (ursprünglicher Haemagglutinationstiter: 1 : 128) und mit einer 0,5 %igen Hühnererythrozytensuspension im Verhältnis 1 : 1 vermischt. Die Zellaufschwemmung war unmittelbar vor ihrer Vereinigung mit dem Virusmaterial in einer Probe derselben Pufferlösung bereitet und kataphoretisch geprüft worden (Meßreihe A). Die das Virus und die roten Blutkörperchen enthaltende Flüssigkeit blieb während 10 min. bei Zimmertemperatur stehen; dann wurden die Erythrozyten in der als Milie vorgesehenen Pufferprobe 1mal gewaschen und suspendiert und anschließend in der Kataphorese-Kammer untersucht. Für jede pH-Stufe der MICHAELIS-Serie (s. Kapitel: Material und Methoden) wiederholte sich diese Prozedur.

Die Abwicklung der Meßreihe C entsprach derjenigen der Meßreihe B, jedoch wurden die (mit 16 agglutinierenden Einheiten) virusvorbehandelten und "trockenen" Erythrozyten zusätzlich in Teilen eines inaktivierten, doppelt adsorbierten Antiserumpräparats (128 hemmende Einheiten) zu einer Zelldichte von 0,5 % verteilt, 10 min. lang stehen gelassen und dann von

der Antiserumverdünnung geschieden. Nach 1maliger Waschung und Aufschwemmung in der als Suspensionsflüssigkeit gewählten Pufferprobe wurden die Erythrozyten zur kataphoretischen Messung in die Cuvette gegeben.

Die Zellmobilitätsbestimmungen erfolgten wie die in Exp. I beschriebenen.

Meßergebnisse:

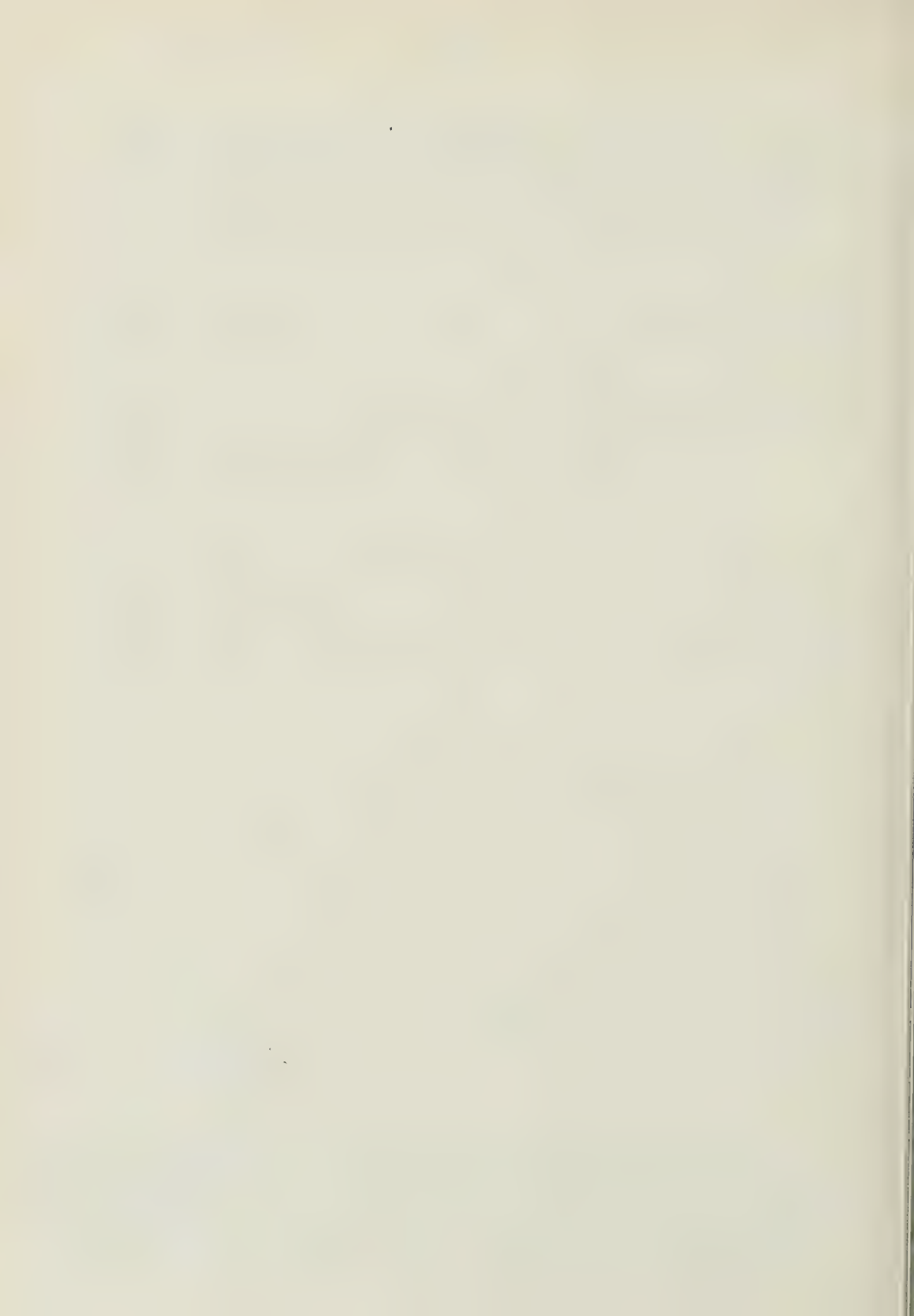
Säuregrad d. Pufferprobe: pH	3,94	4,57	4,64	4,90
------------------------------	------	------	------	------

Beweglkt. d. Zellen in $\frac{\mu}{\text{sec.}}$
Volt/cm

Reihe A	+ 1,28	+ 0,622	+ 0,530	0,000
Reihe B	+ 1,295	+ 0,898	+ 0,707	+ 0,370
Reihe C	+ 1,340	+ 1,060	+ 0,975	+ 0,755

5,17	5,54	6,20	6,85	7,56	8,06	8,70
------	------	------	------	------	------	------

- 0,123	- 0,570	- 0,675	- 0,755	- 0,760	- 0,775	- 0,798
- 0,000	- 0,126	- 0,187	- 0,393	- 0,398	- 0,404	- 0,407
+ 0,397	+ 0,181	- 0,000	- 0,292	- 0,313	- 0,339	- 0,376



H. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) HIRST The agglutination of red cells by allantoic fluid of **chick** embryo infected with influenza virus. Science 94, 22 (1941)
- (2) McCLELLAND and HARE The adsorption of influenza virus by red cells and a new in vitro method for measuring antibodies for influenza virus. Canad. J. publ. Health 32, 530 (1941)
- (3) HIRST The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. J exp. Med. 75, 49 (1942)
- (4) HIRST Adsorption of influenza virus on cells of the respiratory tract. J. exp. Med. 78, 99 (1943)
- (5) BURNET Influenza virus B: I. Observations on growth in chick embryos and on the occurrence of antibodies in Australian Serum. Med. J. Austral. 1, 671 (1942) (+)
- (6) BURNET, BEVERIDGE, BULL and CLARK Investigation of an influenza epidemic in military camps in Victoria. Med. J. Austral. 2, 371 (1942) (+)
- (7) HENLE, HENLE and STOKES Demonstration of the efficacy of vaccination against influenza type A by experimental infection of human beings. J Imm. 46, 163 (1943) (+)
- (8) FRIEDEWALD and PICKELS Size of infective particle and hemagglutinin of influenza virus as determined by centrifugal analysis. Proc. Soc. exp. Biol. a Med. 52, 261 (1943) (+)

- (9) TAYLOR, SHARP, BEARD, DINGLE and FELLER Isolation and characterization of influenza virus A (PR8 strain). J.Imm.47, 261 (1943) (+)
- (10) FRIEDEWALD and PICKELS Centrifugation and ultrafiltration studies of allantoic fluid preparations of influenza virus. J.exp.Med.79, 301 (1944) (+)
- (11) SHARP, TAYLOR, McLEAN, BEARD, FELLER and DINGLE Isolation and characterization of influenza virus B (Lee-strain). Science 98, 307 (1943) (+)
- (12) Dto. J.Imm.48, 129 (1944) (+)
- (13) STANLEY An evaluation of methods for the concentration and purification of influenza virus. J.exp.Med. 79, 255 (1944)
- (14) STANLEY The size of influenza virus. J.exp.Med.79, 267 (1944)
- (15) BURNET The affinity of Newcastle Disease virus to the influenza virus group. J. exp.Biol. 20, 81 (1942)
- (16) HALLAUER Beitrag zur Klassifikation der Hnnerpeststmme. Arch.ges.Virusforschung 3, 356 (1947)
- (17) NAGLER Application of HIRST phenomenon to the titration of vaccinia virus and vaccinia immune serum. Med.J.Austr.1, 281 (1942)
- (18) BURNET and BOAKE The relationship between the virus of infections ectromelia of mice and vaccinia. J.Imm.53, 1 (1946) (+)
- (19) CLARK and NAGLER Agglutination by viruses. The range of susceptible cells with special reference to agglutination by vaccinia virus. Austr.J.exp.Biol.Sci 21, 103 (1943)

- (20) BIELING und
OELRICHS Untersuchungen über die Haemagglutination
durch Gruppevirus. Z. Hyp. 127, 535 (1948) (+)
- (21) HALLAUER (+)
- (22) MILLER and
STANLEY Quantitative aspects of the red blood cell
agglutination test for influenza virus. J. exp.
Med. 79, 185 (1944)
- (23) TWYBLE and
MASON Hemagglutination by products of influenza vi-
rus using infected mouselung and chicken em-
bryo as the source of virus. J. Imm. 49, 73
(1944) (+)
- (24) HIRST Adsorption of influenza hemagglutinins and vi-
rus by red blood cells. J. exp. Med. 76, 195
(1942)
- (25) BRIODY Characterization of the "enzymic" action of
influenza virus on human red cells.
J. Imm. 59, 115 (1948)
- (26) HIRST The nature of the virus receptors of the red
cells. II. The effect of partial heat inactiva-
tion of influenza virus on the destruction of
red cell receptors and the use of inactivated
virus in the measurement of serum inhibitor.
J. exp. Med. 87, 315 (1948)
- (27) BURNET, McCREA
and STONE Modification of human red cells by virus ac-
tion. I. The receptor gradient for virus action
in human red cells. Brit. J. exp. Path. 27, 228
(1946)
- (28) STANLEY The preparation and Properties of influenza vi-
rus vaccines concentrated and purified by dif-
ferential centrifugation. J. exp. Med. 81, 193
(1945) (+)

- (29) SALK Variation in influenza viruses. A study of heat stability of the red cell agglutination factor. Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 63, 134 (1946); Effect of formalin in increasing heat stability of influenza virus hemagglutinin. Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 63, 140 (1946)
- (30) JONES Adaption of influenza virus to heat. Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 58, 315 (1945) (+)
- (31) VOLKERT and The effect of sulfhydryl groups on pneumonia
HORSFALL virus of mice (PVM). J. exp. Med. 86, 383 (1947)
- (32) McLEAN, D. BEARD, The relation of antibody response in swine to
TAYLOR, SHARP dose of the swine influenza virus inactivated
and J. W. BEARD with formalin and with ultraviolet light.
J. Imm. 51, 65 (1945) (+)
- (33) HENLE and HENLE The effect of ultraviolet irradiation on various
properties of influenza virus.
J. exp. Med. 85, 347 (1947) (+)
- (34) BEVERIDGE and "Mumps". II. Virushaemagglutination and serolo-
LIND gical reactions. Austr. J. exp. Biol. a. Med. Sci 24,
127 (1946)
- (35) FAZEKAS DE ST. Modification of virus receptors by metaperiodate.
GROTH and GRAHAM II. Infection through modified receptors. Austr. J.
exp. Biol. a. Med. Sci 27, 83 (1949)
- (36) MILLER Influence of pH and of certain other conditions
on the stability of the infectivity and red cell
agglutination activity of influenza virus. J. exp.
Med. 80, 507 (1944)
- (37) SCHÄFER und Über die Isolierung und Charakterisierung des
SCHRAMM Virus der klassischen Hühnerpest. Z. Naturfor-
schung 5b, 91-102 (1950)

- (38) HENLE, HENLE, Experimental exposure of human subjects to
STOKES and MARIS viruses of influenza. J. Imm. 52, 145 (1946) (+)
- (39) HENLE and HENLE Interference of inactive virus with the propaga-
tion of virus of influenza. Science 98, 87 (1943)
- (40) HENLE, HENLE, Studies on complement fixation with the
GROUPE and CHAMBERS viruses of influenza. J. Imm. 48, 163 (1944) (+)
- (41) HENLE and HENLE Interference between active and inactive viruses
of influenza; incidental occurrence and artificial
induction of phenomenon.
Am. J. med. Sci 207, 705 (1944)
- (42) HENLE and HENLE Studies on the toxicity of influenza viruses.
I. The effect of intracerebral injection of in-
fluenza viruses. J. exp. Med. 84, 623 (1946) (+)
- (43) HENLE and HENLE Studies on the toxicity of influenza viruses.
II. The effect of intraabdominal and intravenous
injection of influenza viruses. J. exp. Med. 84,
639 (1946) (+)
- (44) BURNET and BULL Re-examination of the influenza virus strain
(Melbourne egg". Austr. J. exp. Biol. a. Med. Sci
22, 173 (1944) (+)
- (45) BURNET and BULL Changes in influenza virus associated with adap-
tation to passage in chick embryos.
J. exp. Biol. a. Med. Sci 21, 55 (1943) (+)
- (46) HIRST Studies on the mechanism of adaptation on
influenza virus to mice. J. exp. Med. 86, 357
(1947)
- (47) CHENG - J. WANG The relation of infectious and hemagglutination
titers to the adaptation of influenza virus to
mouse. J. exp. Med. 88, 515 (1948) (+)

- (48) FRIEDEWALD and HOOK Influenza virus infection in the hamster. J. exp. Med. 88, 343 (1948)
- (49) LAUFFER and STANLEY Biophysical properties of preparations of PR 8 influenza virus. J. exp. Med. 80, 531 (1944)
- (50) FRIEDEWALD, MILLER and WHATLEY The nature of non-specific inhibition of virus hemagglutination. J. exp. Med. 86, 65 (1947)
- (51) BURNET and McCREA Inhibitory and inactivating of normal ferret sera against an influenza virus strain. Austr. J. exp. Biol. a. Med. Sci 24, 277 (1946)
- (52) McCREA Unspecific serum inhibition of influenza Hemagglutination. Austr. J. exp. Biol. a. Med. Sci 24, 283 (1946)
- (53) FRANCIS Dissociation of hemagglutinating and antibody-measuring capacities of influenza virus. J. exp. Med. 85, 1 (1947)
- (54) KLEIN and PEREZ The reserval in vivo by Bal of inactivation of influenza A and Diplococcus pneumoniae by bichloride of mercury. J. Imm. 60, 349 (1948)
- (55) FLORMAN and WEISS Storage of influenza virus for use in typing clinical cases. J. Bact. 49, 507 (1945) (+)
- (56) BURGH, HOEW and BOVARNICK Preparation from human red cells of a substance inhibiting virus haemagglutination. J. exp. Med. 87, 1 (1948)
- (57) BURNET The mucinase of V. cholerae. Austr. J. exp. Biol. a. Med. Sci 26, 71 (1948)
- (58) BURNET, McCREA and ANDERSON Mucin as substrate of enzyme action by viruses of the mumps-influenza group. Nature 160, 404 (1947)

- (59) PIPER Untersuchungen über die Wirkung des "Receptor-Destroying-Enzyme" auf menschliche Erythrozyten. *Acta Haematologica* 18, 414 (1957)
- (60) KLENK, FAILLARD Hoppe-Seylers Z. 301, 235 (1955)
und LEMPFRIED
- (61) McCREA Mucins and mucoids in relation to influenza virus action. II. Isolation and characterization of the serum mucoid inhibitor of heated influenza virus. *Austr. J. exp. Biol. a. Med. Sci* 26, 355 (1948) (+)
- (62) ANDERSON Mucins and mucoids in relation to influenza virus action. I. Inactivation by RDE and by viruses of the influenza group of the serum inhibitors of haemagglutination. *Austr. J. exp. Biol. a. Med. Sci* 26, 347 (1948)
- (63) LANNI and BEARD Inhibition by egg-white of hemagglutination by swine influenza virus. *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med.* 68, 312 (1948) (+)
- (64) BURNET Mucins and mucoids in relation to influenza virus action. IV. Inhibition by purified mucoid of infection and haemagglutination with the virus strain WSE. *Austr. J. exp. Biol. a. Med. Sci* 26, 381 (1948) (+)
- (65) BURNET s.(64) V. destruction of "Francis Inhibitor" activity in a purified mucoid by virus action 26, 389 (1948) (+)
- (66) BURNET Mucins and mucoids in Medicine. *Roy Melbourne Hospital Clinical Reports. Centenary Vol. Aug.* 1948 (+)
- (67) BURNET The initiation of cellular infection by influenza and related viruses. *Lancet* 1948, I, 7 (+)

- (68) BURNET s.(64) III. Inhibition of virus hemagglutination by glandular mucins. 26, 371 (1948) (+)
- (69) FRANCIS Apparent serological variation within a strain of influenza virus. Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 65, 143 (1947) (+)
- (70) KNIGHT A sedimentable component of allantois fluid and its relationship to influenza virus. J. exp. Med. 80 (83) (1944) (+)
- (71) KNIGHT The nucleic acid an carbo hydrate of influenza virus. J. exp. Med. 85, 99 (1947) (+)
- (72) LAUFFER and STANLEY Biophysical properties of preparations of PR 8 influenza virus. J. exp. Med. 80, 531 (1944) (+)
- (73) GREEN and WOLLEY Inhibition by vertain polysaccharides of hemagglutination and multiplication of influenza virus. J. exp. Med. 86, 55 (1947) (+)
- (74) SMOLUCHOWSKI zit. in GRAETZ: Handbuch d. Elektriz. u. d. Magn. II, 366 (1921)
- (75) ABRAMSON, MOYER and GORIN Electrophoresis of proteins. New York. Reinhold Publ. Corp. 1942
- (76) ALEXANDER and SAGGERS zit. in RUHENSTROTH-BAUER und SACHTLEBEN: Zellkataphorese. Ergebn. d. med. Grundlagenforschung Bd. II, Stuttgart (1959) im Druck
- (77) PONDER Blood 6, 350 (1951)
- (78) RUHENSTROTH-BAUER und PIPER Zur Methodik der Zellkataphorese. Klin. Wochenschr. 1, 9 (1956)
- (79) HANIG Electrokinetic changes in human erythrocytes during adsorption and elution of PR 8 influenza virus. Proc. exp. Biol. a. Med. 68, 385 (1948)

- (80) ADA and STONE Effect of haemagglutinating viruses on the electrophoretic mobility of human erythrocytes. Nature 165, 189 (1950)
- (81a) SCHÄFER und SCHRAMM Über die Isolierung und Charakterisierung des Virus der klassischen Hühnerpest. I. Z. f. Naturforschg. 5b, 91-102 (1950)
- (81b) MUNK und SCHÄFER Eigenschaften tierischer Virusarten, untersucht an den Geflügelpestviren als Modell; II. Z. f. Naturforschg. 6b, Heft 7 (1951)
- (81c) SCHÄFER, MUNK und ARMBRUSTER s.o.; III 7b, Heft 1
- (81d) ARMBRUSTER, MUNK s.o.; IV, 7b, Heft 11 (1952) und WIEDEMANN
- (81e) SCHÄFER und MUNK s.o.; 7b, Heft 9/10 (1952)
- (81f) SCHÄFER und MUNK s.o.; 7b, Heft 11 (1952)
- (81g) SCHÄFER, ZILLIG und MUNK 9b, Heft 5 (1954)
- (81h) SCHÄFER, ZILLIG und MUNK 9b, Heft 12 (1954);
sämtlich in Zeitschr. f. Naturforschung
- (82) SALK A simplified procedure for titrating hemagglutinating capacity of influenza virus and the corresponding antibody. J. Imm. 49, 87 (1944)
- (83) HERICK, VAN and EATON An unidentified pneumonialike organism isolated during passages in chick embryo. J. Bact. 50, 47 (1945) (+)

- (84) Commission of acute respiratory diseases. Haemagglutination by amniotic fluid from normal embryonated Hen's egg. Proc.Soc.exp.Biol. a. Med. 62, 118 (1946) (+)
- (85) HEINMETS Studies with the electron microscope on the interaction of red cells and influenza virus. J.Bact. 55, 823 (1948) (+)
- (86) PIPER und Untersuchungen über die Proteinadsorption an
RUHENSTROTH- menschlichen Erythrozyten.
BAUER Klin. Wochenschr. 1/2, 11 (1956)
- (87) BURNET and The T-Antigen of guinea pig and human red
ANDERSON cells. Austr. J. exp. Biol. a. Med. Sci 25, 213
 (1947) (+)
- (88) HALLAUER Die Haemagglutination durch Virusarten,
 in Handb.d.Virusforschung, II. Ergänzungs-
 band, Springer, Wien (1950)

(+) Zitiert in: Handbuch der Virusforschung, II. Ergänzungsband (HALLAUER)

LEBENS LAUF

Als Sohn des Hauptlehrers Otto Straub und seiner Ehefrau Gretel wurde ich am 12. April 1935 in Dietersweiler (Schwarzwald) geboren. - Während der Jahre 1941 bis 1945 besuchte ich die Volksschule meiner Heimatgemeinde. Im Herbst 1945 wurde ich in die Kepler-Oberschule Freudenstadt aufgenommen; dieser Anstalt gehörte ich bis zur Versetzung meines Vaters nach Onstmettingen (Schwäbische Alb) an.

Die Verlegung des Familienwohnsitzes machte einen Schulwechsel notwendig, und so trat ich im Frühjahr 1949 in die Oberschule Ebingen (Württemberg) ein. Im Sommer 1952 wurde ich für die Zeit eines Jahres beurlaubt, um als Austauschschüler nach den Vereinigten Staaten zu fahren. - Die Reifeprüfung bestand ich im März 1954.

Im Sommer 1954 schrieb ich mich an der Universität Tübingen ein und studierte die vorklinischen Fächer bis zum Herbst 1956, als ich das Physikum ablegte. Anschließend ging ich zum klinischen Studium nach München. - Im Sommer 1957 nahm ich die der vorliegenden Dissertation zugrunde liegenden Arbeiten auf. Am 10. Juni 1960 schloß ich das medizinische Staatsexamen ab.

Derzeit bin ich mit einer Forschungsaufgabe befaßt (Max Planck-Institut für Biochemie).

